

การตรวจไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมวที่รวดเร็วด้วยวิธี RECOMBINASE POLYMERASE  
AMPLIFICATION (RPA)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช  
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RAPID DETECTION OF FELINE LEUKEMIA VIRUS (FeLV) BY RECOMBINASE POLYMERASE  
AMPLIFICATION (RPA)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and  
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมงที่รวดเร็วด้วยวิธี RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA)
โดย	นายสิทธิโชค ลาซโรจน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา ภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สมพร เตชะงามสุวรรณ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(อาจารย์ ดร.รัชนีพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.สมพร เตชะงามสุวรรณ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงค์จิริกุล)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จตุพร รัตนศรีสมพร)	

สิทธิโชค ลาขโรจน์ : การตรวจไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมวที่รวดเร็วด้วยวิธี RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA). ( RAPID DETECTION OF FELINE LEUKEMIA VIRUS (FeLV) BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA)) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. สพ.ญ. ดร.สมพร เตชะงามสุวรรณ

โรคติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว (Feline Leukemia Virus : FeLV) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสในแมวที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง การตรวจหา FeLV RNA และ โปริไวรัส ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยามีความสำคัญในการแยกระยะต่างๆของโรค ซึ่งวิธี Rapid immunochromatographic assay ที่นิยมใช้ตรวจแอนติเจนนั้นสามารถตรวจได้เพียงการติดเชื้อระยะ Progressive ที่มี Viremia เท่านั้น งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) และ Nested RPA เพื่อตรวจ exogenous FeLV Provirus DNA และ RT-RPA เพื่อตรวจ FeLV RNA และทดสอบตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าเทคนิค RPA สามารถตรวจหา FeLV Provirus ได้ที่ขีดจำกัด 1 ng/ $\mu$ l และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อก่อโรคในแมว มีความไว ความจำเพาะ เทียบกับเทคนิค PCR ที่ร้อยละ 95.89 และ 100 ตามลำดับ ขณะที่ Nested RPA เทียบกับเทคนิค Nested PCR มีความไว ความจำเพาะ ที่ร้อยละ 98.89 และ 96.88 ตามลำดับ การตรวจหา FeLV RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA มีขีดจำกัดที่ 0.1 ng/ $\mu$ l เมื่อเทียบกับเทคนิค RT-PCR และ Rapid Immunochromatographic assay มีความไว ร้อยละ 93.75 และ 95.24 ตามลำดับ และ ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าความสอดคล้องของเทคนิค RPA ทั้งสามวิธีอยู่ในเกณฑ์ดีมาก มีค่าสถิติ kappa เท่ากับ 0.949, 0.958, 0.934 และ 0.951 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ผลผลิต RPA ด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I ซึ่งมีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 แต่มีความไวต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยการแยกบนวุ้นภายใต้กระแสไฟฟ้า อีกทั้งพบว่าเทคนิค RPA และ เทคนิค Nested RPA สามารถตรวจพบแมวที่ติดเชื้อในระยะ Regression จากตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay ถึงร้อยละ 11.9 และ 45.8 ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA หรือ Nested RPA และ FeLV RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ที่พัฒนาขึ้นจึงเป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ สูง รวดเร็วใช้เวลาไม่เกิน 20 นาที ที่อุณหภูมิเดียว สะดวกใช้เพียงเครื่องมือให้ความร้อนทั่วไปในการทำปฏิกิริยา จึงสามารถใช้ในการตรวจระยะของการติดเชื้อ FeLV ในคลินิกสัตว์แพทย์และโรงพยาบาลสัตว์ทั่วไปเพื่อใช้ติดตามพยาธิตะการเกิดโรคของแมวที่ติดเชื้อ รวมทั้งการป้องกันและควบคุมการแพร่เชื้อทั้งแบบแนวระนาบและแนวตั้งได้

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล	ลายมือชื่อนิสิต .....
	ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา	
	ภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5876752037 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Feline leukemia virus, PCR, RPA, Provirus

Sitthichok Lacharoje : RAPID DETECTION OF FELINE LEUKEMIA VIRUS (FeLV)  
BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA). Advisor: Assoc. Prof. Dr.  
NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. SOMPORN  
TECHANGAMSUWAN

Feline Leukemia Virus (FeLV) is a major viral disease in cats causing leukemia and lymphoma. Molecular detections of FeLV RNA and provirus are important for characterization of disease stages. However, the common use of rapid immunochromatographic assay for antigen detection could detect viremia in progressive infection only. In this study, recombinase polymerase amplification (RPA) and Nested RPA were developed for exogenous FeLV provirus DNA detection and RT-RPA for FeLV RNA detection and tested with 122 blood samples collected from cats. The results showed that RPA had limit of detection for FeLV provirus at 1 ng/μl and no cross reaction with other feline pathogens. In comparison to PCR, the sensitivity and specificity of RPA were 95.89% and 100%, respectively. While, Nested RPA compared with Nested PCR had sensitivity and specificity of 98.89% and 96.88%, respectively. FeLV RNA detection by RT-RPA had limit of detection at 0.1 ng/μl. In comparison to RT-PCR and rapid immunochromatographic assay had the sensitivity of 93.75% and 95.24%, respectively and 100% specificity. The concordance of three RPA assays were very good with kappa = 0.934, 0.958, 0.934 and 0.951, respectively. In addition, RPA could be detected by naked eye using SYBR I with high specificity of 100% but lower sensitivity than agarose gel electrophoresis. Moreover, both RPA and Nested RPA assays could detect the infected cats in the regression phase from negative samples using rapid immunochromatographic assay up to 11.9% and 45.8%, respectively. Therefore, FeLV proviral detection by RPA or Nested RPA and FeLV RNA detection by RT-RPA had high sensitivity and specificity, rapid amplification within 20 minutes at isothermal, convenient by using general heating instruments, which are promising for FeLV diagnosis in veterinary clinics and hospitals for prognosis, prevention and control of both horizontal and vertical transmission.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature .....  
Microbiology and Immunology

Academic Year: 2019 Advisor's Signature .....  
Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคล และหน่วยงานต่างๆ จึงขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สมพร เตชะงามสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณามอบความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. รัชนีพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล และรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จตุพร รัตนศรีสมพร ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2561 และกองทุนวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561

ขอขอบพระคุณ โครงการทุนการศึกษาสำหรับบุคลากรสายสนับสนุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บริษัท เบสท์อะโกรคอมพาเนีย จำกัด ที่กรุณาอนุเคราะห์ชุดทดสอบสำเร็จรูป Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit (BIONOTE ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี) สัตวแพทย์ ผู้ช่วยสัตวแพทย์ ประจำคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนิสิตโครงการวิจัยปริญญาบัณฑิต หัวข้อการเปรียบเทียบตัวอย่างเลือดและน้ำในช่องปากในการวินิจฉัยโรค ลิวคีเมียในแมวโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป หลักสูตรสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาในการเก็บตัวอย่างเลือดแมว รวมถึงคณาจารย์บุคลากรภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาต่อครั้งนี้มาโดยตลอด

สิทธิโชค ลาซโรจน์

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
2. คำถามงานวิจัย.....	4
3. สมมติฐานการวิจัย.....	4
4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	4
5. ขอบเขตงานวิจัย.....	4
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 .....	6
ทบทวนวรรณกรรม .....	6
1. ลักษณะทั่วไปทางไวรัสวิทยา.....	6
2. การจัดกลุ่มของเชื้อ .....	7
3. วงจรชีวิต.....	8

4. ช่องทางการติดต่อของโรค.....	9
5. ระบาดวิทยา (Epidemiology) .....	10
6. พยาธิกำเนิด พยาธิสภาพ และการก่อโรค.....	11
7. ระยะของการติดเชื้อ.....	11
8. อาการทางคลินิก .....	13
9. แนวทางการป้องกันและรักษา.....	14
10. การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ FeLV .....	15
11. เทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA) .....	17
12. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA .....	19
บทที่ 3 .....	21
วิธีดำเนินการวิจัย .....	21
1. สารเคมีและน้ำยา.....	21
2. เครื่องมือ.....	22
3. วิธีการทดลอง.....	22
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	22
3.2 การตรวจหา Viral RNA (p27 Antigen) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป .....	24
3.3 การสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างเลือดแมว .....	25
3.4 การเตรียม RNA ให้บริสุทธิ์.....	25
3.5 การวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Nanodrop .....	26
3.6 การโคลนยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus.....	26
3.7 การสกัด FeLV Viral RNA จากวัคซีนเพื่อใช้เป็น RNA ควบคุมบวก .....	28
3.8 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR .....	29
3.9 การแยกขนาด DNA ภายใต้อิทธิพลของไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส.....	29
3.10 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR.....	30

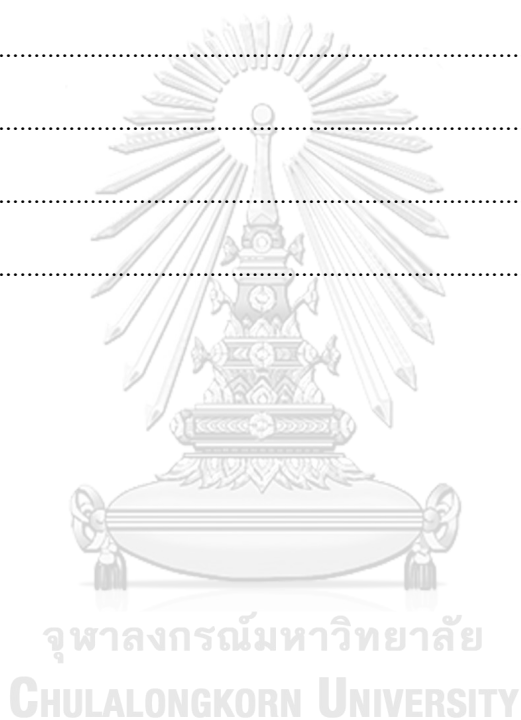


3.11 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA .....	30
3.12 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA.....	33
3.13 การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ One-Step.....	36
3.14 การตรวจหา FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA .....	36
3.15 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value: NPV) ของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA และ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA .....	38
3.16 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจโดยใช้ค่าสถิติ Kappa.....	41
บทที่ 4 .....	43
ผลการดำเนินการวิจัย .....	43
1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง.....	43
2. การตรวจหา Viral RNA (p27 Antigen) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป.....	43
3. การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือดแมว.....	44
4. การโคลนยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus.....	45
5. การตรวจหา FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค PCR .....	45
6. การเปรียบเทียบผลการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assay กับ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR .....	47
7. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR.....	48
8. การเปรียบเทียบผลการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assay กับ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR.....	49
9. การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ One-Step .....	50

10. การเปรียบเทียบผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR กับ Rapid Immunochromatographic Assay.....	51
11. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA.....	52
11.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RPA.....	52
11.2 การทดสอบหาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RPA.....	53
11.3 การทดสอบหาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RPA ที่เหมาะสม .....	54
11.4 การทดสอบความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผล RPA .....	55
11.5 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA.....	56
11.6 การทดสอบความจำเพาะของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA.....	56
11.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส .....	58
11.8 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I .....	59
11.9 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค PCR .....	60
11.10 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus .....	61
12. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA.....	62
12.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA.....	63
12.2 การทดสอบหาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA.....	63
12.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA.....	64
12.4 การทดสอบหาปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA.	64
12.5 การทดสอบความเข้มข้นของ สี SYBR green I.....	66

12.6 การทดสอบชนิดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA .	67
12.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส .....	68
12.8 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยสี SYBR green I.....	69
12.9 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค Nested RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus	69
12.10 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR.....	70
13. การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA.....	72
13.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA .....	73
13.2 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA.....	74
13.3 การทดสอบหาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-RPA .....	74
13.4 การตรวจวิเคราะห์ผล RT-RPA ด้วยสี SYBR green I.....	75
13.5 การทดสอบหาชนิดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA...	76
13. 6 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส .....	76
13.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	78
13.8 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค RT-RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA .....	79
13.9 การเปรียบเทียบผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I กับเทคนิค Rapid immunochromatographic assay.....	79

13.10 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยก ขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค RT-PCR .....	82
15. การตรวจพบเชื้อ FeLV RNA และ Proviral DNA ในแมวป่วยแต่ละกลุ่มอาการ.....	87
บทที่ 5 .....	88
อภิปรายผลการวิจัย.....	88
บทที่ 6 .....	98
สรุปผลการทดลอง.....	98
ภาคผนวก.....	100
บรรณานุกรม.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	121



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ระยะของการติดเชื้อ FeLV และ การพบเชื้อและสารพันธุกรรมในแต่ละระยะ .....	13
ตารางที่ 2	แสดงการใช้อย่างไรไวรัส สารเคมี หรือชีววัตถุ เพื่อรักษาแมวที่ติดเชื้อ FeLV .....	15
ตารางที่ 3	แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ FeLV ในแมวที่พบในปัจจุบัน	17
ตารางที่ 4	แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้ กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR .....	39
ตารางที่ 5	แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค Nested RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาด ภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับ เทคนิค Nested PCR.....	39
ตารางที่ 6	แสดงผลการวิเคราะห์ร่วมระหว่างเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA แล้ววิเคราะห์ ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR.....	40
ตารางที่ 7	แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้ กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RT- PCR.....	40
ตารางที่ 8	แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้ กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Rapid immunochromatographic assay .....	41
ตารางที่ 9	แสดงข้อมูลผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Nested PCR เพื่อหาความสอดคล้องกันของผลการตรวจ ด้วย ค่าสถิติ Kappa.....	42
ตารางที่ 10	แสดงข้อมูลผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เปรียบเทียบกับ เทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay เพื่อหาความสอดคล้องกันของผล การตรวจ ด้วยค่าสถิติ Kappa.....	42

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนตัวอย่างเลือดแมวจากแมวที่แสดงอาการป่วยทางคลินิก แมวที่มาเข้ารับการตรวจสุขภาพ และรับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหัดแมวเลือดขาวในแมว .....	44
ตารางที่ 12 แสดงผลสรุปการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัวอย่าง .....	47
ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus เทคนิค PCR .....	48
ตารางที่ 14 แสดงผลสรุปการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR จากตัวอย่างเลือดแมวที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay และเทคนิค PCR จำนวน 49 ตัวอย่าง .....	49
ตารางที่ 15 แสดงผลสรุปของการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR .....	50
ตารางที่ 16 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบ ด้วยเทคนิค RT-PCR .....	51
ตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assays เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR.....	52
ตารางที่ 18 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมวด้วยเทคนิค RPA วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส จำนวน 122 ตัวอย่าง .....	59
ตารางที่ 19 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	60
ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR.....	61
ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR.....	61
ตารางที่ 22 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยเปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% กับการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	62

ตารางที่ 23 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส.....	68
ตารางที่ 24 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	69
ตารางที่ 25 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA โดยเปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% กับการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	70
ตารางที่ 26 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR.....	71
ตารางที่ 27 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR.....	72
ตารางที่ 28 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมวด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส จำนวน 122 ตัวอย่าง .....	77
ตารางที่ 29 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	78
ตารางที่ 30 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยเปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% กับการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	80
ตารางที่ 31 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assays เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส.....	80
ตารางที่ 32 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I.....	81
ตารางที่ 33 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR.....	83

ตารางที่ 34 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อตรวจสอบด้วย  
 ผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR..... 83

ตารางที่ 35 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ  
 Nested RPA และผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid  
 immunochromatographic assay, RT-PCR และ RT-RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาด  
 ภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I ..... 85

ตารางที่ 36 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าสถิติ  
 Kappa ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ  
 Nested RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Nested PCR และของการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral  
 RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และเทคนิค Rapid  
 immunochromatographic assay โดยวิเคราะห์ผลผลิต RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้  
 กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I..... 86

ตารางที่ 37 สรุปผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ  
 Nested RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส โดยแยก  
 ตามกลุ่มอาการทางคลินิก หรือสาเหตุการป่วยของแมว..... 87



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงองค์ประกอบของ FeLV .....	6
ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบของปิ่นและหน้าที่ในสายนิวคลีโอไทด์ของ FeLV .....	7
ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ FeLV เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน .....	9
ภาพที่ 4 แสดงหลักการของปฏิกิริยา RPA (RPA cycle).....	18
ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Antigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit. 25	
ภาพที่ 6 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิต RPA ในวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 %; M คือ 100 bp DNA ladder เลนที่ 1 คือ โคลน U3LTR และเลนที่ 2 คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ .....	45
ภาพที่ 7 แสดงผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% (A) แสดงผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S44 และ S45 (B) แสดงผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S33; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ .....	46
ภาพที่ 8 แสดงผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% พบผลผลิตขนาด 101 bp จากตัวอย่างหมายเลข S14 S16 S24 และ S25; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ .....	49
ภาพที่ 9 แสดงผลผลิต RT-PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S105 ผลผลิตขนาด 200 bp จากตัวอย่างเลขที่ S114 และผลผลิตขนาด 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S107 และ S110 – S113; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ RNA ที่สกัดจาก FeLV Viral RNA ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ .....	51
ภาพที่ 10 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5 $\mu$ M บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ .....	53

- ภาพที่ 11 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ที่อุณหภูมิในการบ่ม ที่ 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่น ที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 54
- ภาพที่ 12 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ที่ใช้เวลาในการบ่มที่ 40, 30, 20 และ 10 นาที บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 55
- ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบผลผลิต ด้วยสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 25X 50X 75X 100X 200X และ 300X ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจาก เชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ..... 56
- ภาพที่ 14 แสดงการทดสอบปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ; M คือ 100 bp DNA ladder ; เลขที่ 1-4 คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus ความเข้มข้น 1-0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ และเลขที่ 5 คือ น้ำ กลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 57
- ภาพที่ 15 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิต RPA ของเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบนวุ้นอะ กาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 %; M คือ 100 bp DNA ladder เลขที่ 1 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น ตัวควบคุมลบ เลขที่ 2 คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV provirus เป็นตัวควบคุมบวก เลขที่ 3 – 8 คือ เชื้อ FIV, FCV, FHV, FeMV, FCoV และ H. haemofelis ตามลำดับ ..... 57
- ภาพที่ 16 (A) แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S42 - S45 S109 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ โดยผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลขที่ S44 มีขนาดประมาณ 200 bp และตัวอย่างเลขที่ S45 มีขนาด 145 bp (B) แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S101 S102 และ S105 – S109 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็น หลอดควบคุมลบ โดยผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลขที่ S105 มีขนาดผลผลิตทั้งขนาดประมาณ 200 bp และ 145 bp ตัวอย่างเลขที่ S101 และ S107 มีผลผลิตขนาด 145 bp..... 58

ภาพที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S2 ถึง S14; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 59

ภาพที่ 18 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก ตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10, 7.5 และ 5  $\mu\text{M}$  ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 63

ภาพที่ 19 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก ตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 64

ภาพที่ 20 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้เวลาในการบ่มที่ 10, 20 และ 30 นาที ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 65

ภาพที่ 21 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1, 2 และ 3  $\mu\text{l}$  ของตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 66

ภาพที่ 22 แสดงผลการตรวจหา FeLV Proviral ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 25X 50X และ 75X ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 66

ภาพที่ 23 แสดงผลการทดสอบปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิน้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐม

ภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus ที่เจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-4}$   $10^{-6}$   $10^{-8}$  และ C- คือ  
 ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบที่เจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-4}$   $10^{-6}$   $10^{-8}$  ; M  
 คือ 50 bp DNA ladder ..... 67

ภาพที่ 24 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Nested RPA ขนาด 101 bp จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่  
 S65 S69 S70 S73 S74 S78 S80 S86 และ S92 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; M คือ 50  
 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็น  
 ตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 68

ภาพที่ 25 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested  
 RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S1 S2 และ S4 ถึง S8; C+ คือ  
 ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ  
 ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 69

ภาพที่ 26 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยใช้ไพรเมอร์  
 ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu$ M บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA  
 ladder ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัว  
 ควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ..... 73

ภาพที่ 27 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ที่ใช้เวลาในการ  
 บ่มที่ 30, 20 และ 10 นาที บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ;  
 C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก  
 และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 74

ภาพที่ 28 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ที่อุณหภูมิใน  
 การบ่มที่ 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp  
 DNA ladder ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัว  
 ควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 75

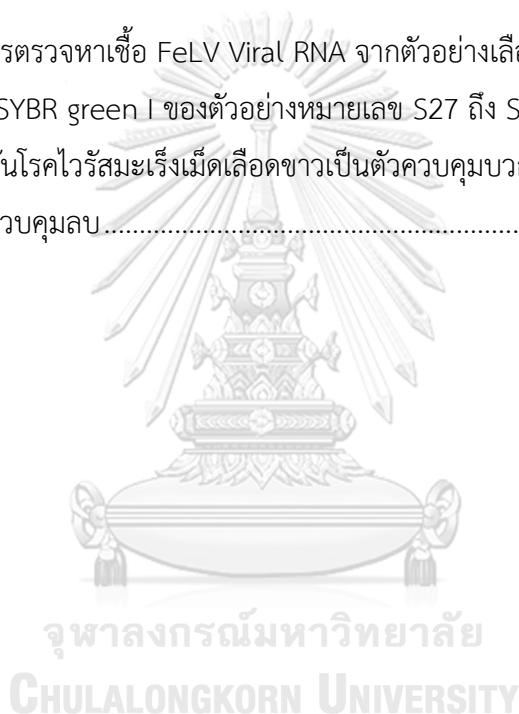
ภาพที่ 29 แสดงผลการตรวจหา FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และตรวจสอบผลผลิต ด้วยสี  
 SYBR I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 240X, 160X, 80X และ 25X ; C+ คือ FeLV Viral  
 RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่  
 ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 76

ภาพที่ 30 แสดงการทดสอบปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค  
 RT-RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ; M คือ 100 bp DNA ladder ; เลขที่ 1 ถึง 5 คือ

RNA มาตรฐานที่สกัดจาก FeLV Viral RNA ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาว ที่ใช้ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/μl ตามลำดับ และเลขที่ 6 คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ..... 77

ภาพที่ 31 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RT-RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S114 – S122 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ โดยจากตัวอย่างเลขที่ S114 ให้ผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp และ 145 bp ส่วนตัวอย่างเลขที่ S115 ถึง S118 และ S122 ให้ผลผลิตขนาด 145 bp..... 78

ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S27 ถึง S35; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ..... 79



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แมว เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเป็นสัตว์เลี้ยงที่นิยมอีกชนิดหนึ่งของมนุษย์ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Felis catus* โรคติดเชื้อในแมวที่ไม่ติดต่อสู่คน ได้แก่ ไข้หัดแมวหรือโรคลำไส้อักเสบในแมว (Feline panleukopenia: FPV) โรคติดเชื้อไวรัสหัดแมว (Feline leukemia virus: FeLV) โรคเอดส์แมว (Feline immunodeficiency virus : FIV) โรคช่องท้องอักเสบติดต่อในแมว (Feline infectious peritonitis : FIP) และโรคติดเชื้อในแมวที่สามารถติดต่อสู่คน เช่น โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies virus)

โรคติดเชื้อไวรัสหัดแมว (FeLV) เป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญในแมว นอกจากก่อให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ยังเป็นสาเหตุของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในแมวหรือในสัตว์ตระกูลแมวอีกด้วย (1, 2) พบการกระจายของโรคในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยพบได้ทั้งในแมวบ้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมวจร แมวที่ติดเชื้อมักจะป่วยด้วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้แก่ Acute myeloid leukemia (AML) (3) มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เช่น Thymic lymphoma, Multicentric lymphoma (1) และโรคทางโลหิตวิทยา อาทิเช่น Myelodysplastic syndromes (MDS), Aplastic anemia (4) โดยอาจติดเชื้อร่วมกับ Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) และพบว่ากว่าร้อยละ 90 ของแมวที่ติดเชื้อนี้จะแสดงอาการป่วย (5) นอกจากนี้เคยมีรายงานติดเชื้อร่วมกับ Feline Immunodeficiency Virus (FIV) ประมาณร้อยละ 3.5 (6) ซึ่งแม้จะมีอุบัติการณ์ต่ำ แต่ก็ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้แมวป่วยจากการติดเชื้อแทรกซ้อนได้

FeLV แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ทั้งหมด 7 Subgroups ได้แก่ FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T, FeLV-AC และ FeLV-D เมื่อเร็วๆ นี้ ได้ค้นพบ Subgroup ใหม่ ได้แก่ FeLV-TG35 เพิ่มอีกหนึ่งชนิด (7) แต่ Subgroup ที่มีความสำคัญทางคลินิกมีอยู่ 3 Subgroups คือ FeLV-A, FeLV-B และ FeLV-C (8) โดย FeLV-A พบได้มากที่สุด ความรุนแรงของโรคอาจไม่สูงนักแต่มีอัตราการแพร่เชื้อค่อนข้างสูง และเป็นสาเหตุของการป่วยด้วยโรคฉวยโอกาสจากภาวะกดภูมิคุ้มกัน FeLV-B เกิดจาก

Recombinant ระหว่าง exogenous FeLV-A กับ Endogenous retrovirus sequence ในแมว (9) มักไม่แพร่เชื้อและกว่าครึ่งหนึ่งมักพบติดเชื้อร่วมกับ FeLV-A ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของโรคที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองมากกว่าการติดเชื้อ FeLV-A เพียงชนิดเดียว (10) ส่วน FeLV-C เกิดจากการกลายพันธุ์ ของ FeLV-A ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะโลหิตจางชนิด Nonregenerative anemia แต่จะไม่มีเพิ่มจำนวนและแพร่เชื้อ (11) ความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นหากพบว่าติดเชื้อ ร่วมกับ FeLV-A

FeLV สามารถติดต่อกันได้ง่ายโดยทางน้ำลาย เลือด หรือสารคัดหลั่งต่างๆ ของแมว แม้กระทั่งอุจจาระ ผ่านทางพฤติกรรมของแมว เช่น การเลีย การกัด ปัจจุบันการรับเชื้อมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นจากการถ่ายเลือด (Blood transfusion) การรักษาในปัจจุบันทำได้เพียงรักษาตามอาการของแมวแต่ละตัว เช่น แมวที่มีภาวะกดการทำงานของภูมิคุ้มกัน ติดเชื้อง่าย อาจต้องให้ยาปฏิชีวนะและ ยาต้านไวรัสในการรักษา (12) แมวที่เป็นโรคมะเร็ง อาจรักษาด้วยการให้เคมีบำบัด (13) เป็นต้น ในขณะที่การป้องกันทำได้ด้วยการฉีดวัคซีนให้กับแมวที่ยังไม่ได้ติดเชื้อ

เมื่อแมวได้รับเชื้อตามธรรมชาติ เช่น จากน้ำลายของแมวที่ติดเชื้อด้วยการเลีย หรือกัดกัน ไวรัสจะเข้าสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลือง Oropharyngeal lymphoid tissue และมีการเพิ่มจำนวน (Replication) เข้าสู่กระแสเลือด เกิดการติดเชื้อไวรัสในกระแสเลือดแบบ Transient viremia ในระยะนี้ร่างกายของแมวอาจกำจัดไวรัสออกไปได้ภายใน 3 สัปดาห์ (14) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของแมวแต่ละตัว แต่ถ้าหากไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ ไวรัสจะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่อยู่ในกระแสเลือด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ และโมโนไซต์ เซลล์ที่ติดเชื้อเหล่านี้เมื่อเข้าระบบน้ำเหลือง ก็จะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง และเพิ่มจำนวนอีกครั้งปล่อยไวรัสเข้าสู่กระแสเลือดอีก จนกระทั่งไวรัสเข้าสู่ไขกระดูกและเพิ่มจำนวน หากยังคงตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดภายหลังการติดเชื้อไปแล้ว 16 สัปดาห์ จะเข้าสู่ระยะ Persistent viremia (14, 15) ซึ่งแมวที่ได้รับเชือนี้าจจะพบเชื้ออยู่ในร่างกายได้ยาวนานตลอดช่วงชีวิต โดยประมาณร้อยละ 50 จะตายภายใน 2 ปี และร้อยละ 80 จะตายภายใน 3 ปี (16)

การวินิจฉัยโรค FeLV มีความสำคัญในทางคลินิก รวมถึงการป้องกันและควบคุมโรค สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธี Rapid immunochromatographic assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ วิธี

Indirect immunofluorescent assay (IFA) วิธี Viral isolation และ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction : PCR) โดยวิธี PCR สามารถแยกแยะระยะของโรคได้ การตรวจหา Provirus ด้วยวิธี PCR จะตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ผ่านกระบวนการ Reverse transcription เป็น Viral DNA และที่แทรกรวมกับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับวิธีการตรวจหา Viral RNA ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) สามารถตรวจหาไวรัสในกระแสเลือดในระยะ Viremia ได้

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเพียงอุณหภูมิเดียว (Isothermal amplification) ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาครั้งแรกในปี ค.ศ. 2006 ใช้เวลาเพียง 20 – 40 นาที ที่อุณหภูมิระหว่าง 37 – 42 องศาเซลเซียส ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จึงสามารถใช้เครื่องมือให้ความร้อนทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องร้อน ตู้บ่ม อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว (17) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคในมนุษย์ ทั้งแบคทีเรียหรือไวรัส เช่น *Mycobacterium tuberculosis* (18) และ Dengue virus (19) เป็นต้น หรือแม้แต่ในทางสัตวแพทย์เองก็เริ่มนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในสัตว์ เช่น เชื้อ Canine parvovirus ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในสุนัข (20) Feline herpesvirus-1 (FHV-1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคระบบทางเดินหายใจส่วนบน และโรคติดเชื้อในตาของแมว (21)

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยวิธี RPA และ Nested RPA โดยการเปรียบเทียบกับวิธี Conventional PCR และ ตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยวิธี RT-RPA เปรียบเทียบกับวิธี Immunochromatographic assay และ RT-PCR เพื่อนำไปใช้ในการตรวจระยะของการติดเชื้อ FeLV ได้อย่างรวดเร็ว ง่าย สะดวก ณ จุดดูแลสัตว์ป่วย โดยไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ซับซ้อนและมีราคาแพง สามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยไวรัส FeLV ในสถานพยาบาลสัตว์ต่างๆ และยังพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปที่อ่านด้วยตาเปล่าได้ในอนาคต



## 2. คำถามงานวิจัย

1. เทคนิค RPA และ Nested RPA สามารถตรวจหา FeLV Provirus และเทคนิค RT-RPA สามารถตรวจหา FeLV Viral RNA ได้หรือไม่

2. เทคนิค RPA และ Nested RPA มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าเทคนิค PCR และ Nested PCR หรือไม่

3. เทคนิค RT-RPA มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าเทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay หรือไม่

## 3. สมมติฐานการวิจัย

1. เทคนิค RPA และ Nested RPA สามารถตรวจหา FeLV Provirus และเทคนิค RT-RPA สามารถตรวจหา FeLV Viral RNA ได้

2. เทคนิค RPA และ Nested RPA มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าเทคนิค PCR และ Nested PCR

3. เทคนิค RT-RPA มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าเทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay

## 4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA และตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

2. เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA กับเทคนิค PCR และ Nested PCR และการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA กับเทคนิค RT-PCR และชุดตรวจ Immunochromatographic assay

## 5. ขอบเขตงานวิจัย

ตัวอย่างเลือดแมวที่สงสัยว่าติดเชื้อ FeLV จำนวน 122 ตัวอย่าง ได้มาจากโรงพยาบาลสัตว์ เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาตรวจคัดกรองด้วยวิธี

Immunochromatographic assay ทำการพัฒนาเทคนิค RPA และ Nested RPA ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus เปรียบเทียบกับวิธี PCR และตรวจหา FeLV Viral RNA เปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR และ Immunochromatographic assay

## 6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. นำเทคนิค RPA ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ FeLV ในกระแสเลือด เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว รวมทั้งช่วยในการวางแผนการรักษา ควบคุม และป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว

2. สามารถนำไปใช้ตรวจหาเชื้อ FeLV ในแมว ณ จุดดูแลสัตว์ป่วย ณ สถานพยาบาลสัตว์ ที่ไม่มีเครื่องมือ และอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา



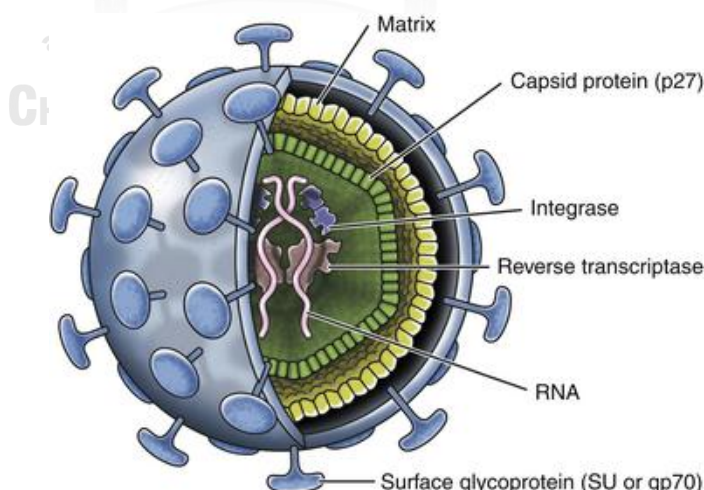
## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 1. ลักษณะทั่วไปทางไวรัสวิทยา

จากหลักฐานวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ ไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว (Feline Leukemia Virus: FeLV) น่าจะถือกำเนิดขึ้นราว 10 ล้านปีมาแล้ว จากไวรัสในบรรพบุรุษของสัตว์จำพวกตระกูลหนูที่อาศัยอยู่ในทะเลทรายบนดินแดนของทวีปอเมริกาเหนือ และติดต่อสู่บรรพบุรุษสัตว์ตระกูลแมวจากการกินหนูเป็นอาหารหรือถูกหนูกัด มีหลักฐานพบว่าแมวกินหนูที่ติดเชื้อไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (Murine Leukemia Virus: MuLV) เกิดการติดเชื้อโดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MuLV แทรกอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ของแมว และมีการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น (14)

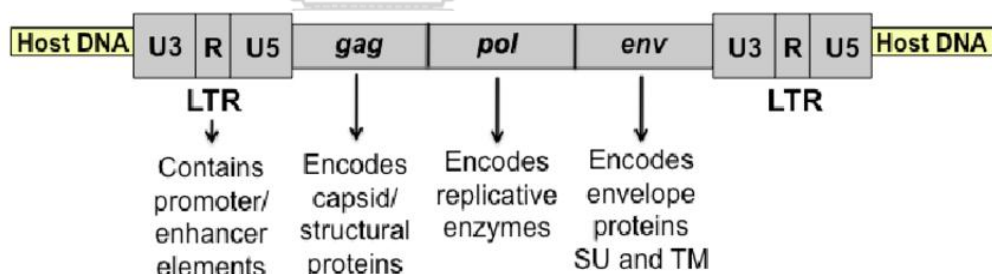
FeLV ได้มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1964 โดย William Jarrett และคณะ โดยการแยกเชื้อไวรัสจากพลาสมาของแมวที่ติดเชื้อ (22) ปัจจุบันจัดอยู่ใน Family Retroviridae (23) เป็นไวรัสในกลุ่ม Gammaretrovirus (10) โดยมีโครงสร้างแบบ Enveloped RNA viruses และมีสารพันธุกรรมเป็นแบบ Single-stranded RNA บรรจุอยู่ภายใน Capsid (10) ดังภาพที่ 1 (24)



ภาพที่ 1 แสดงองค์ประกอบของ FeLV

RNA ของเชื้อ FeLV แบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ *gag pol* และ *env* ดังภาพที่ 2 (25) บริเวณส่วนปลายของ Single-stranded RNA ทั้ง 2 ข้าง ยังประกอบไปด้วยส่วนที่เรียกว่า U3, R และ U5 Long Terminal Repeats (LTRs) ส่วน U3 เกี่ยวข้องกับกระบวนการแสดงออกของยีน โดยมีส่วนสำคัญที่เรียกว่า Transcriptional enhancer และ Transcriptional promoter (25)

*gag* ควบคุมการสร้าง Core proteins ที่สำคัญได้แก่ p27 p15c และ p10 (23) ซึ่งมีความสำคัญในการสร้าง capsid protein โดยเฉพาะ p27 เป็นโปรตีนที่ใช้ในตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีวิทยา เช่น วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Immunochromatographic assay, Direct fluorescence antibody assay เป็นต้น (26) *pol* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Reverse transcriptase และ *env* ควบคุมการสร้าง Envelop proteins ที่สำคัญคือ Surface (SU) glycoprotein gp70 เป็นแอนติเจนที่จำเพาะของ Subgroups A, B, C และ T ทำให้ไวรัสจับกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนี้ gp70 ยังเป็นบริเวณที่ตอบสนองต่อกระบวนการ Neutralizing antibody จากระบบภูมิคุ้มกันของแมวอีกด้วย (10) *env* ยังมีอีกส่วนที่สำคัญคือ p15E ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้าง Transmembrane protein (10)



ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบของยีนและหน้าที่ในสายนิวคลีโอไทด์ของ FeLV

## 2. การจัดกลุ่มของเชื้อ

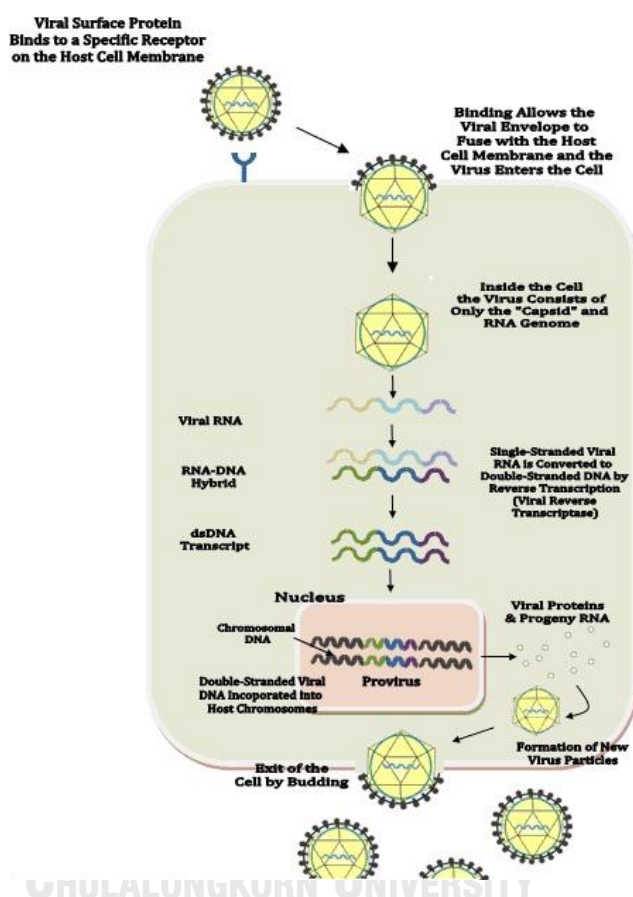
FeLV สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ทั้งหมด 7 Subgroups คือ FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T, FeLV-AC, FeLV-D และ FeLV-TG35 เมื่อแบ่งตามการแสดงออกของยีนบน *env* ที่ควบคุมการสร้าง Envelop proteins ที่จำเพาะกับตัวรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้านพบว่า Thiamine transporter THTR1 เป็นตัวรับที่จำเพาะสำหรับ FeLV-A (27) ในขณะที่ตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของ FeLV-B คือ Phosphate symporter Pit-1 (28) และ Pit-2 (29) สำหรับตัวรับที่จำเพาะบนผิว

เซลล์ของ FeLV-C คือ Heme exporter FLVCR (30) ส่วน FeLV-T มีตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของ FeLV-T คือ Pit-1 และต้องการ FeLV Infectivity X-accessory (FeLIX) เป็น co-factor (25, 27, 31) FeLV-A พบได้มากที่สุด แต่ความรุนแรงของโรคน้อย มีอัตราการแพร่เชื้อค่อนข้างสูง และเป็นสาเหตุของการป่วยด้วยโรคฉวยโอกาสจากภาวะกดภูมิคุ้มกัน FeLV-B เกิดจาก Recombinant ระหว่าง exogenous FeLV-A กับ Endogenous retrovirus sequence ในแมว (9, 32, 33) มักไม่แพร่เชื้อและกว่าครึ่งหนึ่งมักพบติดเชื้อมาร่วมกับ FeLV-A ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสียหายของโรคที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองมากกว่าการติดเชื้อ FeLV-A เพียงชนิดเดียว (10) FeLV-C เกิดจากการกลายพันธุ์ของ FeLV-A ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะโลหิตจางชนิด Nonregenerative anemia แต่จะไม่มี การเพิ่มจำนวนและแพร่เชื้อ (11) FeLV-T นั้นพบได้น้อยมาก เกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่ง SU ของ *env* gene โดยกว่าร้อยละ 96 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FeLV-T เหมือนกับ FeLV-A, FeLV-B และ FeLV-C (33, 34) โดย FeLV-T สามารถชักนำให้เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันในตัวอ่อน (35) FeLV-D เกิดจากการถ่ายทอด *env* gene แบบ transduction จาก endogenous retrovirus ในแมว บ้าน จนเกิดเป็น endogenous FeLV (enFeLV) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *env* gene แตกต่างไป จากเดิม (35) FeLV-TG35 เกิดจากการกลายพันธุ์ของ FeLV-A เช่นเดียวกับ FeLV-C (35) ส่วน FeLV-AC เป็นลูกผสมระหว่าง FeLV-A กับ FeLV-C บริเวณ *env* gene (36)

### 3. วงจรชีวิต

เมื่อ FeLV เข้าจับกับเซลล์เป้าหมาย เช่น ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ จะมีการเชื่อมระหว่างผิวเซลล์กับ Envelope ของไวรัสเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนของ Nucleocapsid จะแตก ปล่อย RNA เข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ Reverse transcriptase เปลี่ยน RNA เป็น DNA ในขั้นตอนนี้ เอนไซม์ Reverse transcriptase ที่ใช้ มีคุณสมบัติแบบ Exonuclease activity นั่นคือ ในระหว่างการต่อสายนิวคลีโอไทด์ อาจมีเบสซึ่งไม่ใช่เบสคู่สมกับ RNA แม่แบบของไวรัสเข้ามา และไม่ได้รับการแก้ไขให้ถูกต้อง ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสได้ (31) จากนั้นจะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้านและแทรก DNA ของไวรัสเข้าไปรวมกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นเมื่อ DNA ของเซลล์เจ้าบ้านทำการถอดรหัสและแปลรหัส DNA ของไวรัสจะได้รับการถอดรหัสและแปลรหัสด้วยเช่นกัน mRNA ที่ได้จะออกสู่ Cytoplasm เพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส โดย Envelope protein ถูกสร้างและส่งออกไปที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน Capsid protein ที่สังเคราะห์ได้จะจับตัว

กันและหุ้ม (Encapsulation) ส่วนของ RNA ที่จับกันเป็นไดเมอร์ ได้เป็น Nucleocapsid จากนั้นจะเคลื่อนตัวไปที่ใต้ชั้น Lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมี Envelope protein บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นอยู่ก่อนแล้ว จากนั้นจึงดันเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านจนบุตและหลุดออกมาในลักษณะของการ Budding ได้เป็นไวรัสอนุภาคใหม่ (Virion) ดังภาพที่ 3 (37)



ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ FeLV เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

#### 4. ช่องทางการติดต่อของโรค

FeLV สามารถติดต่อกันได้ระหว่างแมวโดยทางน้ำมูก น้ำลาย เช่น การเลียกัน หรือ กัดกัน แสดงให้เห็นว่ามีการปล่อยเชื้อออกมาผ่านทางน้ำลายในปริมาณสูงจากแมวที่ติดเชื้อ โดยมีการศึกษาเพื่อตรวจหา p27 antigen Viral RNA ในน้ำลายและพลาสมา ของแมวที่ได้รับการฉีดเชื้อ FeLV-A สายพันธุ์ Glasgow ด้วยวิธี ELISA พบว่า ในน้ำลายให้ผลบวกร้อยละ 83.5 ส่วนในพลาสมา ให้ผลบวกร้อยละ 91.5 (38) เชื้อยังสามารถถูกปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมทางอุจจาระ ซึ่งได้มีการ

ทดสอบโดยการทำ Rectal swab และแยกเชื้อไวรัสด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง QN10S พบว่าเกิด Cytopathic effect (CPE) ขึ้น แล้วทำการตรวจยืนยันโดยการนำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากเซลล์เพาะเลี้ยง มาตรวจด้วยวิธี Real-time RT-PCR และ ELISA (p27 antigen) รวมถึงยังมีการตรวจหา Provirus ด้วยวิธี Real-time PCR โดยทั้งหมดนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้มาจากเลือดของแมวที่ติดเชื้อ FeLV ซึ่งพบว่า ปริมาณไวรัสที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอุจจาระมีปริมาณน้อย โดยเฉพาะ Provirus ซึ่งมีปริมาณน้อยมากที่ถูกปล่อยออกมา (39) อย่างไรก็ตาม หากเลี้ยงแมวมารวมกันหลายตัว และมีตัวใดตัวหนึ่งรับเชื้อมา โดยที่ยังใช้กระบะทรายในการขับถ่ายอุจจาระและของเสียร่วมกันมี โอกาสที่จะแพร่เชื้อและรับเชื้อระหว่างกันได้ รวมทั้งแมวที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกมีโอกาสที่จะไป แพร่เชื้อสู่สิ่งแวดล้อมหรือรับเชื้อเข้ามาได้ด้วยเช่นกัน เชื้อยังสามารถแพร่ทางปัสสาวะได้ด้วย (39) การติดต่อผ่านทางเลือด จากการถ่ายเลือด หรือจากการตั้งครอกโดยถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก และยังสามารถแพร่เชื้อได้โดยผ่านพาหะจำพวกปรสิตภายนอกที่ดูดเลือดเป็นอาหาร อาทิเช่น หมัดแมว (Cat flea; *Ctenocephalides felis*) โดยสามารถตรวจพบ Viral RNA ของ FeLV จากหมัดแมวและ อุจจาระของหมัดแมวที่ดูดเลือดแมวที่ติดเชื้อ FeLV และมีไวรัสอยู่ในกระแสเลือด (40) ดังนั้น พฤติกรรมการเลียขนให้กันของแมวอาจเพิ่มความเสี่ยงในการได้รับเชื้อ FeLV ผ่านทางปากจาก อุจจาระของหมัดแมวได้ นอกจากนี้ จากการศึกษาในแม่แมวที่ติดเชื้อ FeLV แบบแฝง พบว่าเชื้อ FeLV สามารถติดต่อจากแม่สู่ลูก และยังสามารถผ่านทางน้ำนมได้ด้วย (41)

## 5. ระบาดวิทยา (Epidemiology)

มีการศึกษาเกี่ยวกับไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างมากมายและแพร่หลายทั่วโลก อุบัติการณ์ของการเกิดโรคพบว่าบางประเทศมีอุบัติการณ์ต่ำ โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว บางประเทศมีอุบัติการณ์สูงซึ่งมักพบในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น พบในแคนาดาเพียงร้อยละ 3.4 (42) ในทวีปยุโรป เช่น เยอรมนี พบเพียงร้อยละ 3.6 (43) ขณะที่ในกลุ่มประเทศแถบตะวันออกกลาง เช่น อิหร่าน พบร้อยละ 14.2 (44) มาเลเซียพบสูงถึงร้อยละ 31.3 (45) ในประเทศไทย ในปี ค.ศ. 2009 พบอุบัติการณ์ร้อยละ 24.5 (46) และในระหว่างปี ค.ศ. 2013 - 2014 พบร้อยละ 16.5 (6)

มีการศึกษาพบเชื้อ FeLV ในสัตว์ป่าจำพวกเสือ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา พบ FeLV ระบาดในเสือพูมา (*Puma concolor coryi*) ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2002 - 2005 พบว่า ลักษณะ

ทาง Genotype ของ FeLV ที่ได้จากเสือพูม่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากกับลักษณะทาง Genotype ของ FeLV subgroup A ที่พบจากแมวบ้านในสหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถยืนยันได้ถึง การติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ของ FeLV (47) ในประเทศไทย จากการศึกษาในเสือและแมวป่า ในปี ค.ศ. 2004 – 2005 ด้วยวิธี Rapid immunochromatographic assay พบเชื้อร้อยละ 6.67 จากตัวอย่างของกลุ่มเสือและแมวป่าที่มีสุขภาพดี และเมื่อตรวจหา FeLV provirus ด้วยวิธี Nested PCR จากตัวอย่างกลุ่มเดียวกัน พบว่าให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 66.67 (48)

## 6. พยาธิกำเนิด พยาธิสภาพ และการก่อโรค

ไวรัสชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว ซึ่งเกิดจากยีนส่วนที่เรียกว่า Viral oncogene มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ Proto-oncogenes ที่พบได้ในเซลล์ปกติของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์จะทำการเพิ่มจำนวนโดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase เปลี่ยน RNA สายเดี่ยว เป็น DNA สายคู่ เรียกว่า Provirus DNA ซึ่งจะแทรกรวมกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ในบริเวณที่ใกล้เคียงหรือชิดกับตำแหน่ง Proto-oncogene เช่น *c-myc*, *bmi-1*, *pim-1* เป็นต้น ในแมวที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองพบว่า Proto-oncogene เหล่านี้เป็น Integration sites ที่พบลำดับเบสของ FeLV แทรกอยู่ การที่ DNA ของไวรัสเข้าไปแทรกตัวบริเวณดังกล่าว จะไปกระตุ้นให้ Proto-oncogene ทำงาน หรือไปก่อกำหนดการทำงานของ Tumor suppressor gene ทำให้การทำงานของเซลล์เจ้าบ้านนั้นผิดปกติเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง (15, 25)

## 7. ระยะของการติดเชื้อ

ระยะการติดเชื้อแบ่งตามการตรวจพบเชื้อไวรัสและสารพันธุกรรมในกระแสเลือด ได้ 3 ระยะ ดังสรุปในตารางที่ 1 คือ

7.1 Abortive infection โดยปกติแล้ว FeLV Provirus และ FeLV Viral RNA สามารถตรวจพบได้ภายใน 1 สัปดาห์ ภายหลังจากติดเชื้อ (14) และพบ Viral RNA ในกระแสเลือดได้นาน 2-3 สัปดาห์ หลังจากแมวได้รับเชื้อ แมวที่มีภูมิคุ้มกันดีจะสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้และหายเป็นปกติ โดยไม่มีเชื้ออยู่เลย ซึ่งลักษณะการติดเชื้อแบบนี้เรียกว่า Abortive infection (49) พบว่าสาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะแมวได้รับเชื้อเข้าไปจำนวนไม่มากนัก (15, 50)



7.2 Regressive infection ในแมวบางตัวเชื้ออาจอยู่ในกระแสเลือดและมีการเพิ่มจำนวนในระยะเวลาสั้นๆ จนระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถกำจัดได้ อาจก่อนหรือหลังไวรัสเข้าสู่เซลล์ในกระดุก exogenous viral RNA จะถอดรหัสเป็น Proviral DNA และแทรกตัวเข้ากับจีโนมของโฮสต์ ทำให้ตรวจไม่พบไวรัสในกระแสเลือด เรียกว่า การติดเชื้อแฝง (Latent infection) ซึ่งมักเกิดขึ้นได้หลังจากที่แมวได้รับเชื้อในกระแสเลือดนานมากกว่า 3 สัปดาห์ (16, 51, 52) และเรียกแมวที่ติดเชื้อในระยะนี้ว่า Regressor cat (14) แต่หากชิ้นส่วน DNA ของ Provirus มีการแทรกเข้าไปอยู่ในเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cells) แล้วถ่ายทอดจากรุ่นพ่อ แม่ สู่รุ่นลูก (Vertical transmission) เป็น endogenous FeLV (enFeLV) ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้ก่อโรค (35) enFeLV สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่แมวยังเป็นตัวอ่อนในครรภ์ (Embryo) และยังคงอยู่จนลูกแมวนั้นโตเป็นตัวเต็มวัย (53) enFeLV ไม่อยู่ในรูปของอนุภาคไวรัส (Virions) จึงไม่สามารถแพร่เชื้อติดต่อกันได้ แต่หากแมวที่มี enFeLV อยู่แล้ว ได้รับ Exogenous FeLV-A (exFeLV-A) จะเกิดการ Recombination ขึ้นได้ เป็น FeLV- B (54)

อย่างไรก็ตามเชื้ออาจกลับเข้าสู่กระแสเลือดทำให้แมวแสดงอาการป่วยได้อีก โดยมีสาเหตุเหนี่ยวนำ เช่น ภาวะกดภูมิคุ้มกันหรือระดับแอนติบอดีลดลง (15) หากเกิดการติดเชื้อร่วม FeLV - FIV (Feline Immunodeficiency Virus) จะเพิ่มความรุนแรงของการเกิดโรค เช่น พบภาวะ Thymic atrophy Lymphopenia Neutropenia รวมถึงความผิดปกติของนิวโทรฟิลล์ การลดลงของ CD4+ และ CD8+ (55) นอกจากนี้การได้รับสารกลุ่ม Glucocorticoids มีส่วนเหนี่ยวนำกระตุ้นให้ไวรัสกลับเข้าสู่กระแสเลือดได้ (14)

7.3 Progressive infection การติดเชื้อในระยะนี้ จะสามารถตรวจพบ FeLV Viral RNA ในกระแสเลือดได้นานเกินกว่า 16 สัปดาห์จากวันที่ได้รับเชื้อ (15)

การแบ่งระยะจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยสรุป คือ ภายในระยะเวลา 3-16 สัปดาห์แรก อาจตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดแบบ Transient viremia หรืออาจตรวจไม่พบเชื้อภายหลังจากที่ได้รับเชื้อมาแล้ว 16 สัปดาห์ แสดงว่าแมวมีการติดเชื้อแบบ Regressive infection แต่ถ้ายังคงตรวจพบไวรัสในกระแสเลือด หลังจากที่ได้รับเชื้อมาแล้ว 16 สัปดาห์ แสดงว่าแมวมีการติดเชื้อ

แบบ Persistent viremia ซึ่งเป็นการติดเชื้อในระยะ Progressive infection (15) ดังสรุปในตารางที่ 1 (15)

ตารางที่ 1 ระยะของการติดเชื้อ FeLV และ การพบเชื้อและสารพันธุกรรมในแต่ละระยะ

ระยะของการติดเชื้อ	FeLV p27 antigen จากเลือด	การเพาะแยกเชื้อไวรัสจากเลือด	การตรวจหา Viral RNA จากเลือด	การตรวจหา Viral DNA จากเลือด
Progressive	Positive	Positive	Positive	Positive
Regressive	Negative	Negative	Negative	Positive
Abortive	Negative	Negative	Negative	Negative

## 8. อาการทางคลินิก

อาการที่พบได้บ่อยที่สุดของแมวที่ติดเชื้อ FeLV คือ ภาวะโลหิตจางและภาวะกดภูมิคุ้มกัน และพบว่ามักป่วยเป็นโรคมะเร็ง รวมถึงความผิดปกติของระบบเลือดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีโรคที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน อาจพบโรคทางระบบประสาทร่วมด้วย (15) จะเห็นได้ว่าอาการทางคลินิกของแมวที่ติดเชื้อ แสดงออกมาได้หลากหลาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของแมวแต่ละตัว รวมถึงชนิดของ FeLV เช่น ติดเชื้อ FeLV subgroup A ร่วมกับ FeLV subgroup B มักพบว่าแมวมีโอกาสที่จะป่วยเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองร่วมด้วย FeLV subgroup C มักพบโรคโลหิตจางชนิด Nonregenerative anemia เป็นต้น (14)

โรคมะเร็งที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ FeLV ของแมวที่พบได้บ่อย ได้แก่ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Mediastinal lymphoma หรือ Thymic lymphoma (15) สามารถตรวจพบ FeLV Proviral DNA ได้จากก้อนมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในแมวที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ FeLV (15, 56) มะเร็งเม็ดเลือดขาว จากการติดเชื้อ FeLV (Provirus) ในเซลล์ต้นกำเนิดที่ไขกระดูก ทำให้สร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาในปริมาณสูงผิดปกติ แต่ในแมวบางตัวอาจสร้างออกมาในปริมาณต่ำ ทำให้

แมวติดโรคแทรกซ้อน มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดในปริมาณต่ำ เกิดภาวะโลหิตจาง และเกล็ดเลือดต่ำได้ มะเร็งชนิดอื่นที่พบได้คือ มะเร็งชนิด Fibrosarcoma (15)

ภาวะกดภูมิคุ้มกันเป็นสาเหตุให้แมวติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่าย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิลล์มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบฟาโกไซโตซิสและการเคลื่อนที่แบบ Chemotactic ลดลง เม็ดเลือดขาวชนิด CD4<sup>+</sup> helper T-cells และ CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cells มีจำนวนลดลง (15, 57) ส่งผลต่อปริมาณของ Cytokines ที่จำเป็นในการกระตุ้นการทำงานของ B-cells ลดลงด้วย (15, 58)

## 9. แนวทางการป้องกันและรักษา

โรคติดเชื้อ FeLV จะมุ่งเน้นไปที่การป้องกันและการจัดการทั้งแมวที่ยังไม่ได้รับเชื้อและแมวที่ติดเชื้อ การป้องกันที่ดีที่สุดคือการเลี้ยงแมวในระบบปิด ป้องกันการติดเชื้ออันเกิดจากพฤติกรรมที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อของแมว นอกจากนี้เรายังสามารถป้องกันการติดเชื้อได้โดยการจำกัดพฤติกรรมของแมว เช่น การออกนอกบ้าน การไม่นำแมวที่ยังไม่ทราบประวัติชัดเจนเข้ามาเลี้ยงร่วมกับแมวที่เลี้ยงอยู่ก่อนแล้ว เป็นต้น การตรวจหาเชื้อในแมวที่มาบริจาคเลือด ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อเช่นกัน (52)

การฉีดวัคซีน เป็นการป้องกันการติดเชื้อจากโรคดังกล่าวที่ดีที่สุด ถึงแม้ว่าจะไม่ได้ผล 100% ก็ตาม วัคซีนที่ใช้ ได้แก่ วัคซีนเชื้อตาย ชนิดตัวเชื้อทั้งตัวหรือบางส่วน of เชื้อ (Subunit) วัคซีนเชื้อเป็นชนิด Canarypox virus vector ซึ่งประกอบไปด้วยยีนส่วน *gag env* และ บางส่วนของ *pol* ของเชื้อ สามารถฉีดได้โดยไม่ต้องพึ่งพาสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvant) เชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ แต่ขาดความสมบูรณ์ เนื่องจากจะมีการแสดงออกของยีนเพียง 2 ยีน คือ *gag* และ *env* จึงไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแมวทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (10, 59) ในขณะที่การรักษาแมวที่ติดเชื้อจะรักษาตามอาการ ทั้งการให้เคมีบำบัดในกรณีที่มีการพัฒนาของโรคเป็นมะเร็ง การรักษาด้วยการใช้ยาต้านไวรัส และการรักษาด้วยการสร้างระบบภูมิคุ้มกันหรือกดภูมิคุ้มกัน (Immunomodulator) ซึ่งทั้งหมดได้รับการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2 (52)

ตารางที่ 2 แสดงการใช้ยาต้านไวรัส สารเคมี หรือชีววัตถุ เพื่อรักษาแมวที่ติดเชื้อ FeLV

ยา หรือสารเคมี	ประเภทของการออกฤทธิ์
Acemannan	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน
Didanosine	ยาต้านไวรัส
Diethylcarbamazine	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน
Feline interferon omega	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นยาต้านไวรัส
Lavamisole	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน
Lymphocyte T-cell immunomodulator	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน
Recombinant human interferon alpha	ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นยาต้านไวรัส
Suramin	ยาต้านไวรัส
Zidovudine	ยาต้านไวรัส

## 10. การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ FeLV

### 10.1 วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส

#### 10.1.1 การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส FeLV

เป็นวิธีการตรวจในงานประจำวันทั้งในโรงพยาบาลสัตว์และคลินิกสัตว์เลี้ยง โดยตรวจหา FeLV p27 antigen ซึ่งเป็นส่วนของ Capsid protein วิธีการตรวจมีหลายวิธี อาทิเช่น วิธี Direct immunofluorescence assay เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ตรวจหาเชื้อ FeLV บนเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ตรวจหา FeLV ในช่วงสัปดาห์แรกของติดเชื้อในกระแสเลือด (14) วิธี Rapid immunochromatographic assay มักใช้เพื่อตรวจกรองไวรัสในกระแสเลือดในงานประจำวันจาก เลือด พลาสมา ซีรัม โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งง่าย สะดวก และประหยัดเวลา นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจหาไวรัสที่ถูกปล่อยออกมา (Shedding) ในน้ำลายได้ด้วย (38)

### 10.1.2 การตรวจหาสารพันธุกรรม

10.1.2.1 ตรวจหา Provirus (Viral DNA) สามารถแยกการติดเชื้อในระยะ Regressive ได้ โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่บริเวณ U3 ในส่วน Long terminal repeats (LTRs) (U3LTRs) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง Exogenous FeLV (exFeLV) และ Endogenous FeLV (enFeLV) จึงสามารถตรวจแยก exFeLV ออกจาก enFeLV (53) เทคนิคที่ใช้ได้แก่ Conventional PCR, Nested PCR (60-63) , Real-time PCR (qPCR) (26, 49) พบว่าประมาณร้อยละ 5 – 10 ของแมวที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติเจนของ FeLV จะให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR (14) อย่างไรก็ตามปัจจุบันการตรวจหา Provirus ในประเทศไทยยังไม่ได้รับความนิยม เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางอนุชีววิทยาและผู้เชี่ยวชาญ ที่มีราคาแพง ใช้เวลานานกว่า มีความยุ่งยาก ไม่สะดวก และไม่สามารถตรวจได้ทันที ณ จุดดูแลสัตว์ป่วย

10.1.2.2 การตรวจหา Viral RNA โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่บริเวณ U3LTR ของเชื้อ FeLV เทคนิคที่ใช้ได้แก่ RT-PCR, Nested RT-PCR (62, 64) Real-time RT-PCR (qRT-PCR) (65, 66) ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อ FeLV ได้ในเชิงปริมาณ

### 10.1.3 การเพาะแยกเชื้อไวรัส

เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจยืนยันการติดเชื้อ แต่ข้อเสียคือ วิธีการยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ได้แก่ Feline embryonic fibroblast cell line (FEA) (67, 68) จึงไม่นิยมใช้ในงานประจำวัน

## 10.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ FeLV

วิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่างแมวที่ติดเชื้อและแมวที่ได้รับวัคซีน ดังนั้นหากไม่ทราบประวัติวัคซีนของแมวจะไม่สามารถบอกได้ว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบเกิดขึ้นจากสาเหตุใด การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ FeLV ยังไม่สามารถแยกระยะของการติดเชื้อได้ ดังนั้นการตรวจหา

แอนติบอดีต่อเชื้อ FeLV จึงไม่มีประโยชน์ในการพยากรณ์โรคและการรักษา แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียดังสรุปได้ในตารางที่ 3

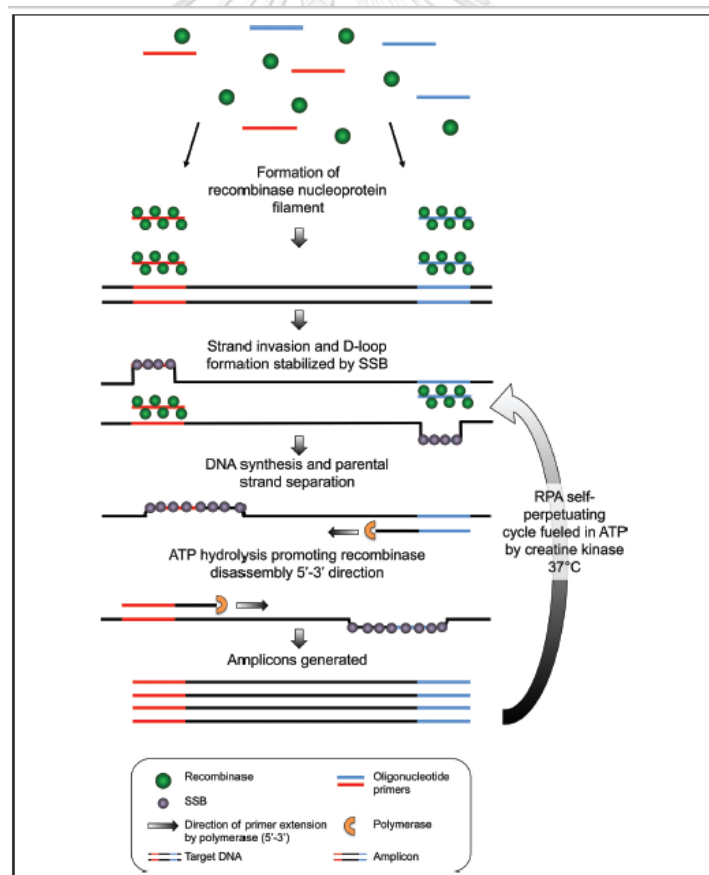
ตารางที่ 3 แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ FeLV ในแมวที่พบในปัจจุบัน

วิธีการตรวจ	Free virus (Viral RNA)	Provirus (Viral DNA)	ความสะดวก อุปกรณ์ และ บุคลากร	ระยะเวลาที่ใช้ ในการตรวจ
Viral Isolation	พบ	ไม่พบ	ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และอุปกรณ์จำนวนมาก	2-3 สัปดาห์
IFA	พบ	ไม่พบ	ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และอุปกรณ์ จำนวนมาก	1-2 วัน
Immunochromatographic assay	พบ	ไม่พบ	สะดวก ไม่จำเป็นต้องมีบุคลากร ที่มีความชำนาญ และอุปกรณ์ จำนวนมาก	10 นาที
PCR	ไม่พบ	พบ	ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และอุปกรณ์จำนวนมาก	1-2 วัน
RT-PCR	พบ	ไม่พบ	ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และอุปกรณ์จำนวนมาก	1-2 วัน

#### 11. เทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

เทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เราสนใจ ได้ในเวลาเพียง 20 – 40 นาที ที่อุณหภูมิ 37 – 42 องศาเซลเซียส ปฏิกริยาเริ่มจากไพรเมอร์ (Forward primer และ Reverse primer) ที่จำเพาะกับตำแหน่งที่สนใจ จับกับเอนไซม์รีคอมบิเนส ได้เป็นสายนิวคลีโอไทด์โปรตีน สามารถแทรกเข้าไปจับกับเบสคู่สมใน DNA สายคู่ที่เป็น DNA แม่แบบได้ ทำให้บริเวณนั้นโป่งออกเหมือนอักษร D (D loop) จากนั้น Single strand binding protein (SSB) จะจับกับ DNA สายเดี่ยวอีกเส้น บริเวณตรงข้ามไพรเมอร์ ซึ่งจะทำให้บริเวณดังกล่าวมีความเสถียรและคงสภาพเป็น DNA สายเดี่ยว ทำให้เอนไซม์โพลิเมอร์เรสสามารถต่อสายนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ สร้างเป็น DNA สายใหม่ได้ โดยเอนไซม์โพลิเมอร์เรสที่ใช้ในปฏิกริยา RPA ได้แก่ *suaDNA polymerase* ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และในขณะที่มีการต่อสายนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์รีคอมบิเนสจะแยกออก

จากไพรเมอร์ ด้วยกระบวนการ ATP hydrolysis ทำให้เอนไซม์รีคอมบิเนสสามารถกลับมาจับกับไพรเมอร์ที่เหลือในปฏิกิริยา และดำเนินปฏิกิริยาตามกระบวนการเดิมของปฏิกิริยาได้ ส่วนโมเลกุลของ SSB จะมาจับกับ DNA สายเดี่ยวจนยาวขึ้นเรื่อยๆ เพื่อให้การต่อสายนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ฝั่งตรงข้ามยังคงดำเนินต่อไป โดยโมเลกุลของ SSB จะหลุดออกจาก DNA สายเดี่ยว เมื่อเอนไซม์โพลีเมอเรสต่อสายนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ที่จับกับเบสคู่สมบน DNA สายเดี่ยวเส้นเดียวกันนั้น ต่อสายนิวคลีโอไทด์มาถึง SSB จะถูกแทนที่ด้วยเบสคู่สม ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นซ้ำแบบทวีคูณ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา RPA (RPA product) ดังภาพที่ 4 (17) การออกแบบไพรเมอร์ของ RPA ความยาวไพรเมอร์ควรมีขนาด 30 – 35 เบส สัดส่วนของเบส G และ C ควรอยู่ระหว่างร้อยละ 30 – 70 และให้ผลผลิต RPA ระหว่าง 80 – 400 คู่เบส ขนาดผลผลิต RPA ที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่าง 100 – 200 คู่เบส (17, 69)



ภาพที่ 4 แสดงหลักการของปฏิกิริยา RPA (RPA cycle)

## 12. การประยุกต์ใช้เทคนิค RPA

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค RPA ไปใช้กันอย่างหลากหลาย เช่น การตรวจหาไวรัส Yam Mosaic ด้วยวิธี RT- exo RPA การตรวจหาจุลชีพในน้ำสำหรับการบริโภค การตรวจหาจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร เช่น เชื้อ *Salmonella*, *Listeria* และ *Campylobacter* การตรวจคัดกรองผู้ติดเชื้อไวรัสอีโบล่า ไวรัสเดงกีในมนุษย์ ในทางสัตวแพทย์ ได้มีการนำเทคนิค RPA มาใช้ในการตรวจไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปากและเท้าเปื่อยในสัตว์กีบ (Foot-and-mouth disease virus: FMDV) ด้วยวิธี RT- RPA exo probe เปรียบเทียบกับวิธี Real-time RT-PCR พบว่า มีความไวในการตรวจวินิจฉัยที่ร้อยละ 98 และ 100 ตามลำดับ และ RT- RPA exo probe สามารถตรวจพบเชื้อ FMDV เมื่อปฏิบัติกริยาดำเนินไปได้ 3.7 – 7 นาที (70) การตรวจหาเชื้อไข้หวัดนก (Avian influenza) สายพันธุ์ H5N1 โดยตรวจยีน Hemagglutinin subtype H5 ด้วยวิธี RT-RPA exo probe พบว่าสามารถตรวจหา ยีน H5 ภายใน 7 นาที ขณะที่วิธี Real-time RT-PCR ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 90 นาที RPA มีความไวร้อยละ 100 และมีความจำเพาะเท่ากับ Real-time RT-PCR (71) การตรวจหาไวรัส PRRS ชนิดที่ 2 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus type 2 : PRRSV-2) ด้วยวิธี RT-RPA exo probe โดยใช้ไพรเมอร์ และ exo probe ที่จำเพาะต่อยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ Nucleocapsid ของไวรัส ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าความไวของการตรวจด้วยวิธี RT-RPA exo probe เท่ากับ 690 copies แต่ขาดความจำเพาะเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross-reaction) กับเชื้อ Classical PRRSV และ Highly pathogenic PRRSV (20) การตรวจยีน VP2 ซึ่งเป็น Conserved region ของเชื้อ Canine parvovirus ชนิดที่ 2 (CPV-2) กลุ่มย่อย a (CPV-2a) และ b (CPV-2b) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบในสุนัข ด้วยวิธี RPA พบว่า สามารถตรวจยีนได้ในปริมาณเพียง 10 copies ต่อปฏิกิริยา และมีความจำเพาะต่อเชื้อ CPV-2a และ CPV-2b เท่านั้น ขณะที่วิธี PCR ต้องมี DNA อย่างน้อย 100 copies ต่อปฏิกิริยา (20)

การตรวจหาเชื้อก่อโรคในแมว พบว่าได้มีผู้ที่ศึกษาและพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิค RPA เช่นกัน ได้แก่ เชื้อ Feline herpes virus ชนิดที่ 1 (FHV-1) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและโรคตาในแมว โดยตรวจหา ยีน Thymidine kinase (TK gene) ของเชื้อ FHV-1 ด้วยวิธี RPA exo probe โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสามารถตรวจหา ยีนได้ในปริมาณอย่างน้อย 100 copies ต่อปฏิกิริยา ซึ่งเท่ากับวิธี real-time PCR มี



ความจำเพาะสูงเนื่องจากให้ผลตรวจเป็นลบต่อเชื้อก่อโรคอื่นๆ (21) การตรวจหาเชื้อ Feline parvovirus (FPV) ซึ่งเป็นสาเหตุของการป่วยด้วยโรคไข้หัดแมวด้วยเทคนิค Lateral flow dipstick RPA (LFD-RPA) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีน VP2 พบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เพียง 15 นาที โดยขีดจำกัดในการตรวจอยู่ที่ 100 copies และมีความไวมากกว่าเทคนิค PCR (72)

ในการศึกษาครั้งนี้สนใจที่จะพัฒนาเทคนิค RPA และ RT-RPA เพื่อตรวจ Provirus และ Viral RNA ในกระแสเลือดของแมวได้ ซึ่งน่าจะมีความสะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการที่จำเพาะ สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ FeLV ในแมว ณ จุดดูแลสัตว์ป่วย เช่น ในคลินิกสัตว์แพทย์หรือโรงพยาบาลสัตว์



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. สารเคมีและน้ำยา

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม DNA และ RNA ประกอบด้วย ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® *cador*® Pathogen จากบริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมนี ใช้สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างทดสอบ ชุดน้ำยา NucleoSpin® RNA Virus จากบริษัท MACHERY-NAGEL ประเทศเยอรมนี สำหรับสกัดสารพันธุกรรมจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาว และกำจัด การปนเปื้อนของ DNA รวมถึงการเตรียม RNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป TURBO DNA – *free*<sup>TM</sup> Kit จากบริษัท ThermoFisher SCIENTIFIC (Invitrogen) ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ประกอบด้วย ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GoTaq® Green จากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AccessQuick<sup>TM</sup> RT-PCR System จากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา และไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA และ RT-RPA ประกอบด้วย ชุดน้ำยา TwistDx<sup>TM</sup> Basic kit จากบริษัท TwistDx<sup>TM</sup> ประเทศสหราชอาณาจักร และไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ตรวจสอบผลผลิตในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ประกอบด้วย ชุดน้ำยา NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up จากบริษัท MACHERY-NAGEL ประเทศเยอรมนี สำหรับการเตรียมผลผลิตให้บริสุทธิ์ วัณอะกาโรส จากบริษัท SERVA ประเทศเยอรมนี ผงบัฟเฟอร์สำเร็จรูปชนิด TBE (Tris-Borate-EDTA) จากบริษัท VWR® Life Science ประเทศสหรัฐอเมริกา DNA มาตรฐานชนิด 100 bp GeneDireX® จากบริษัท BIO-HELIX สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) DNA มาตรฐานชนิด 50 bp และ 6X loading dye จากบริษัท Biotechrabbit ประเทศเยอรมนี

วัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาว Nobivac® Feline 2-FeLV จากบริษัท Merck Animal Health/ Intervet Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 2. เครื่องมือ

ชุดทดสอบสำเร็จรูป Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit จากบริษัท BIONOTE ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ThermoScientific NanoDrop Lite จากบริษัท ThermoFisher SCIENTIFIC ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม TECHNE รุ่น <sup>3</sup>Prime จากบริษัท Cole-Parmer ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่อง Gel electrophoresis MUPID®-EXu จากบริษัท TaKara ประเทศญี่ปุ่น และเครื่อง Gel Documentation AlphaInnotech - Alphamager Mini จากบริษัท ProteinSimple ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 3. วิธีการทดลอง

### 3.1 การเก็บตัวอย่าง

โครงการวิจัยผ่านการรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่รับรอง CU-ACUC 1831010

คัดเลือกแมวที่แสดงอาการป่วยและสงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV หรือป่วยเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง หรือมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยไม่ระบุเพศ อายุ จากแมวที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์ความเป็นเลิศด้านโรคแมวและคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีรายละเอียดเกณฑ์คัดเลือกแมวที่แสดงอาการป่วยทางคลินิกดังนี้

3.1.1 กลุ่มที่มีเนื้องอกหรือมะเร็ง เช่น ต่อมน้ำเหลืองโตผิดปกติทั้งบางบริเวณและทั่วร่างกาย เนื้องอกที่ช่องอก เนื้องอกในระบบทางเดินอาหาร

3.1.2 กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV และโรคติดเชื้ออื่นๆ

3.1.3 กลุ่มของแมวที่ป่วยง่าย มีไข้ รักษาให้หายยาก และไวต่อการติดเชื้อแทรกซ้อนต่างๆ อันเนื่องมาจากภาวะการกดการทำงานของภูมิคุ้มกัน

3.1.4 กลุ่มที่แสดงอาการทางระบบเลือด เช่น ภาวะโลหิตจาง มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด (Acute Myeloblastic Leukemia: AML) รวมถึงกลุ่มอาการที่เรียกว่า Myelodysplastic syndrome (MDS)

3.1.5 กลุ่มที่มาเข้ารับวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมวหรือเข้ารับการตรวจสุขภาพ

คำนวณหาขนาดตัวอย่างด้วยสูตรของ N.M. Buderer (73) โดยมีรายละเอียดดังนี้

$N_1$  = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เมื่อกำหนดความคาดหวังค่าความไวในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA ที่ร้อยละ 95

$N_2$  = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เมื่อกำหนดความคาดหวังค่าความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA ที่ร้อยละ 95

$Z_{\alpha/2}$  = ค่าคะแนนมาตรฐานเมื่อกำหนดให้ระดับนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือ 1.96

$SN$  = กำหนดความคาดหวังค่าความไวในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA ที่ร้อยละ 95

$SP$  = กำหนดความคาดหวังค่าความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA ที่ร้อยละ 95

$P$  = อัตราส่วนของการเกิดอุบัติเหตุการณ์ ในที่นี้คือ  $16.5/100 = 0.165$

$W$  = กำหนดช่วงความกว้างของค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% CI) ความไวในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA ที่ร้อยละ 10

$$N1 = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \frac{SN(1-SN)}{W^2}}{P}$$

$$\text{จะได้ } N1 = \frac{1.96^2 \frac{0.95(1-0.95)}{0.1^2}}{0.165} = 110.59 \text{ หรือ } 111 \text{ ตัวอย่าง}$$

$$N2 = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \frac{SP(1-SP)}{W^2}}{(1-P)}$$

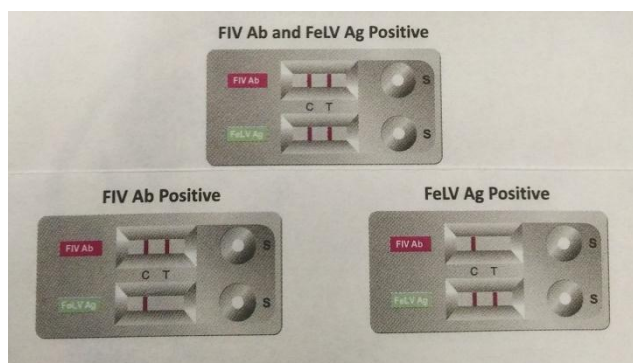
$$\text{จะได้ } N2 = \frac{1.96^2 \frac{0.95(1-0.95)}{0.1^2}}{(1-0.165)} = 21.85 \text{ หรือ } 22 \text{ ตัวอย่าง}$$

จากการคำนวณ N1 มีค่ามากกว่า N2 ดังนั้นจึงใช้จำนวนตัวอย่างทดสอบ ในการพัฒนาตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA อย่างน้อย 111 ตัวอย่าง ในการศึกษาคั้งนี้เก็บตัวอย่างจากแมวจำนวนทั้งสิ้น 122 ตัวอย่าง โดยเจาะเลือดแมวประมาณ 0.5 – 1 มิลลิลิตร (ml) ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2 การตรวจหา Viral RNA (p27 Antigen) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

นำเลือดที่เจาะเก็บจากแมวที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV มาตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA เพื่อดูว่าแมวมีการติดเชื้อแบบ Progressive infection หรือไม่ ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit (ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เบสท์อะโกรคอมพาเนียน จำกัด) ซึ่งอาศัยหลักการ Immunochromatographic assay ทำการทดสอบตามวิธีของเอกสารคำแนะนำการใช้ชุดทดสอบ โดยหยดตัวอย่างเลือด 1 หยด หรือ ประมาณ 10 ไมโครลิตร ( $\mu$ l) ลงในหลุมสำหรับหยดตัวอย่าง (สัญลักษณ์ S) ทั้ง 2 หลุม จากนั้นหยด FIV Ab/FeLV Ag Assay Diluent หลุมละ 2 หยด หรือประมาณ 60  $\mu$ l จับเวลา 10 นาที

การอ่านผล ผลบวกจะปรากฏเส้นสีแดงตรงตัวอักษร T (Test) และ C (Control) ผลลบจะปรากฏเส้นสีแดงตรงตัวอักษร C เท่านั้น ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Antigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit (ภาพประกอบจากคู่มือการใช้งานชุดทดสอบสำเร็จรูป Antigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit)

### 3.3 การสกัด DNA และ RNA จากตัวอย่างเลือดแมว

นำเลือดที่เจาะเก็บจากแมวที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV ปริมาตร 200  $\mu$ l มาสกัด DNA และ RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® *cador*® Pathogen (QIAGEN ประเทศเยอรมันนี) เริ่มจากเติม Proteinase K ปริมาตร 20  $\mu$ l บัฟเฟอร์ VXL ปริมาตร 100  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า Vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเติมบัฟเฟอร์ ACB ปริมาตร 350  $\mu$ l แล้วเขย่าด้วย Vortex จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงใน QIAamp Mini column ที่อยู่ใน Collection tube ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 600  $\mu$ l ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 600  $\mu$ l ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Membrane filter แห่ง ย้าย QIAamp Mini column ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AVE ปริมาตร 70  $\mu$ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วัดปริมาณ DNA และ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัด Thermo Scientific NanoDrop Lite เก็บรักษา DNA และ RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.4 การเตรียม RNA ให้บริสุทธิ์

แบ่งสารพันธุกรรมที่สกัดได้ในข้อ 3.3 ปริมาตร 30  $\mu$ l มาใช้เตรียม RNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป TURBO DNA - free™ Kit (Invitrogen ประเทศ สหรัฐอเมริกา) เริ่มจากเติมบัฟเฟอร์

10x DNase ปริมาตร 3  $\mu$ l และเอ็นไซม์ TURBO DNase ปริมาตร 1  $\mu$ l (2U) เขย่าด้วย Vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำยา DNase Inactivation Reagent ปริมาตร 3  $\mu$ l เขย่าด้วย Vortex บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาที ระหว่างบ่มพลิกหลอด 2-3 ครั้ง และเมื่อครบเวลาเขย่าด้วย Vortex อีกครั้ง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000  $\times$  g นาน 1 นาที 30 วินาที ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml วัดปริมาณ RNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเครื่องวัด Thermo Scientific NanoDrop Lite

### 3.5 การวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Nanodrop

ดูตัวอย่าง DNA หรือ RNA ที่สกัดปริมาณ 1  $\mu$ l หยดตรงตำแหน่งที่อ่านค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องวัด Thermo Scientific NanoDrop Lite วัดปริมาณ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm เครื่องจะคำนวณปริมาณ DNA โดยอัตโนมัติ มีหน่วยเป็น ng/ $\mu$ l และแสดงอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง  $A_{260}/A_{280}$  ความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ควรมีค่าระหว่าง 1.7 - 1.9 และความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้ควรมีค่าประมาณ 1.9 - 2.1

### 3.6 การโคลนยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus

โคลนยีนบริเวณตำแหน่ง U3LTR ซึ่งจำเพาะกับการตรวจหา exFeLV (25, 74) เพื่อใช้โคลน DNA ในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และเป็น DNA ควบคุมบวกในการตรวจหา FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว โดยมีขั้นตอนดังนี้

#### 3.6.1 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR

นำ DNA ที่สกัดจากเลือดแมวที่ยืนยันแล้วว่าติดเชื้อ FeLV มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV ที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Tandon และคณะ ในปี 2005 (75) ดังนี้ U3F RPA: 5'- AAACAGCAGAAGTTTCAAGGCCGCTACCAG-3' และ U3R RPA: 5'-CTGATGGCTCGTTTTATAGCAGAAAGCGCGCG-3' ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GoTaq® Green (Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วย Master Mix ปริมาตร 12.5  $\mu$ l ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 pmole/ $\mu$ l ปริมาตรเส้นละ 0.5  $\mu$ l DNA ความ

เข้มข้น 20 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10.5  $\mu$ l ทำปฏิกิริยาที่สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 65 องศาเซลเซียส 1 นาที 73 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และที่ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (TECHNE รุ่น <sup>3</sup>Prime ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% โดยให้ผลผลิตขนาด 145 bp จากนั้นนำผลผลิต PCR ปริมาตร 25  $\mu$ l มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL ประเทศเยอรมนี) โดยผสมให้เข้ากันกับสารละลายบัฟเฟอร์ NT1 50  $\mu$ l จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างผลผลิต PCR ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700  $\mu$ l สองครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g ครั้งละ 30 วินาที จากนั้นชะผลผลิต PCR ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NE ปริมาตร 30  $\mu$ l โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 1 นาที จะได้ผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีการดังข้อ 3.5

### 3.6.2 การโคลนยีนส่วนของ U3LTR

นำผลผลิต PCR ส่วนของ U3LTR จากข้อ 3.6.1 ปริมาณ 7.25 ng ปริมาตร 1  $\mu$ l ผสมลงใน 2xT4 DNA ligation buffer ปริมาตร 5  $\mu$ l พลาสมิด pGEMT<sup>®</sup>-T Easy Vector ปริมาณ 50 ng ปริมาตร 1  $\mu$ l เอนไซม์ T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 3 Weiss units/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l และเติม Nuclease free water ปริมาตรรวมสุดท้าย 10  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

นำ DNA ลูกลูกผสมเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี Transformation ด้วยชุด Competent cells เริ่มจากละลาย competent *E.coli* ปริมาตร 200  $\mu$ l บนน้ำแข็ง จากนั้นเติม DNA ลูกลูกผสมปริมาตร 20  $\mu$ l แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม LB broth ปริมาตร 800  $\mu$ l บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 100  $\mu$ l Spread ลงบน LB agar ที่ผสม Ampicillin ที่



ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml และมี IPTG เข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 µl กับ 4% X-Gal ปริมาตร 50 µl บนหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่าเป็ *E. coli* ที่ได้รับ DNA ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ เพาะเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 3 ml ที่ผสม Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด DNA สำเร็จรูป Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit โดยดูดเชื้อที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 600 µl ผสมกับ 7X lysis buffer ปริมาตร 100 µl จากนั้นเติม Neutralization Buffer ที่เย็น ปริมาตร 350 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 3 นาที เมื่อครบเวลา ดูดส่วนใสใส่ลงใน Zymo-Spin™ IIN column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 15 วินาที ล้างด้วย Endo-Wash Buffer ปริมาตร 200 µl แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 15 วินาที ล้างพลาสมิดที่สกัดได้อีกครั้งด้วย Zyppy™ Wash Buffer ปริมาตร 400 µl แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 30 วินาที จากนั้นจึงชะพลาสมิด DNA ออกมาด้วย Zyppy™ Elution Buffer ปริมาตร 30 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g นาน 15 วินาที ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด U3LTR ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 3.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เตรียมพลาสมิด DNA จากข้อ 3.6.2 แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปยังบริษัท BIONEER Corporation ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี บันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์มของบริษัทได้แก่ ประเภทของสารพันธุกรรมที่ส่งวิเคราะห์ ปริมาตร ความเข้มข้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพลาสมิด pGEMT®-T Easy Vector ได้แก่ SP6 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ATTTAGGTGACACTATAG -3 จากนั้นนำผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน FeLV LTR ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NCBI BLAST

### 3.7 การสกัด FeLV Viral RNA จากวัคซีนเพื่อใช้เป็น RNA ควบคุมบวก

สกัด FeLV Viral RNA จากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหมีเหม็ดเลือดขาว Nobivac® Feline 2-FeLV (Merck Animal Health/ Intervet Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา) ด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin®

RNA Virus (MACHEREY-NAGEL ประเทศเยอรมนี) เพื่อใช้เป็น RNA ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และเป็นตัวควบคุมบวกในการตรวจหา FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว โดยเติมวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหัดเม็ดเลือดขาว 150  $\mu$ l ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ RAV1 ที่มีส่วนผสมของ Carrier RNA ปริมาตร 600  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 600  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน NucleoSpin® RNA Virus Columns จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g นาน 1 นาที ล้าง RNA ที่สกัดได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ RAW 500  $\mu$ l 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ RAV3 อีก 2 ครั้ง ครั้งแรกใช้ปริมาตร 600  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g นาน 1 นาที และ ครั้งที่ 2 ปริมาตร 200  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 5 นาที ชะ RNA ที่สกัดได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ RE ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50  $\mu$ l แล้วปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 1 นาที วัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ตามขั้นตอนในข้อ 3.5 แล้วเก็บรักษา RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.8 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR

นำ DNA ที่สกัดจากแมวที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV ในข้อ 3.3 มาตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีดังข้อ 3.6.1 ซึ่งจะให้ผลผลิตขนาด 145 bp

### 3.9 การแยกขนาด DNA ภายใต้อิทธิพลไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

เตรียมวุ้นอะกาโรส (SERVA ประเทศเยอรมนี) ความเข้มข้น 1.5% โดยผสมผงวุ้นอะกาโรสกับสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (Tris-Borate-EDTA) (VWR® Life Science ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 0.5 เท่า พร้อมด้วยสี Ethidium bromide (AppliChem ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในวุ้นอะกาโรสเท่ากับ 5% เมื่อวุ้นพร้อมใช้ทำการแยกขนาด DNA ภายใต้อิทธิพลไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง Gel electrophoresis (MUPID®-EXu ประเทศญี่ปุ่น) เมื่อครบเวลาตรวจสอบผลผลิตภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (AlphaInnotech - Alphasizer Mini ประเทศสหรัฐอเมริกา)

### 3.10 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR

จากงานวิจัยของ Tozon และคณะ ในปี 2008 พบว่า เทคนิค Nested PCR เพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค PCR (76) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค Nested PCR บริเวณตำแหน่ง U3LTR ของเชื้อ FeLV โดยนำผลผลิต PCR ที่ให้ผลลบจากจากวิธี PCR ในข้อ 3.8 มาตรวจหา FeLV Provirus โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณภายใน U3LTR ของ exogenous FeLV ดังนี้ U3F3 RPA: 5'-AAATTTCAAGGCCGCTACCAGCAGTCTCCAGG- 3' และ U3R4 RPA: 5'-AGAAGCGAGAGGCGTGGGGATTGGTTAGTTAA-3' ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GoTaq® Green ในปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย Master Mix ปริมาตร 12.5 µl ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 pmole/µl ปริมาตรเส้นละ 0.5 µl ผลผลิต PCR ปฐมภูมิที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 เท่า ปริมาตร 1 µl และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10.5 µl ทำปฏิกิริยาที่สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 45 นาที 73 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และที่ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม TECHNE จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% โดยจะให้ผลผลิตขนาด 101 bp

### 3.11 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

#### 3.11.1 การทดสอบปฏิกิริยา RPA

ทำปฏิกิริยา RPA ด้วยชุดน้ำยา TwistDx™ Basic kit (บริษัท TwistDx ประเทศสหราชอาณาจักร) ในปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.8 ความเข้มข้น 10 µM ปริมาณ 2.4 µl น้ำยา Rehydration buffer 29.5 µl DNA โคลน U3LTR จากข้อ 3.6 ความเข้มข้น 20 ng/µl ปริมาตร 1 µl และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 12.2 µl ดูดส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5 µl ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา 8 - 10 ครั้ง Spin down แล้วบ่มใน Heat block โดยทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA ได้แก่ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลา

### 3.11.2 การทำผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิต RPA มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up โดยผสมสารละลายบัฟเฟอร์ NT1 100 µl จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Columns แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที ล้างผลผลิต RPA ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 µl สองครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g ครั้งละ 30 วินาที จากนั้นชะผลผลิต PCR ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ NE ปริมาตร 30 µl โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 1 นาที จะได้ผลผลิต RPA ที่บริสุทธิ์นำไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% โดยให้ผลผลิตขนาด 145 bp ดังข้อ 3.9

### 3.11.3 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RPA

#### 3.11.3.1 การทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50 µl ดังข้อ 3.11.1 ทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์ที่ 10, 5 และ 2.5 µM บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

#### 3.11.3.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50 µl ดังข้อ 3.11.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.3.1 บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

#### 3.11.3.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50 µl ดังข้อ 3.11.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.3.1 บ่มใน Heat block ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ

3.11.3.2 บ่มที่เวลาต่างๆดังนี้ 10, 20, 30 และ 40 แล้วทำผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

3.11.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RPA

เนื่องจาก SYBR green I มีคุณสมบัติในการจับกับดีเอ็นเอสายคู่ และให้สีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว (77) ในงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยสี SYBR green I โดยนำผลผลิต RPA มาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 300X, 200X, 100X, 75X, 50X และ 25X ปริมาตร 2  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน อ่านผลด้วยตาเปล่าทันที โดยใช้ผู้อ่านผลจำนวน 3 คน และอ่านผลภายใต้แสงสีขาวยจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ การอ่านผลผลบวกจะเห็นสีเขียว ผลลบจะเห็นสีส้ม

3.11.5 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

เจือจาง DNA โคลน U3LTR ในข้อ 3.6 ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ นำ DNA ที่เจือจางปริมาตร 1  $\mu$ l มาทำปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.11.1 ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.3.1 - 3.11.3.3 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

3.11.6 ทดสอบความจำเพาะของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

นำ DNA และ cDNA ปริมาตร 1  $\mu$ l ของไวรัสชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของโรคติดต่อเชื้อไวรัสในแมว ดังนี้ Feline calicivirus (FCV), Feline immunodeficiency virus (FIV), Feline coronavirus (FCoV), Feline herpesvirus (FHV), Feline morbillivirus (FeMV) และ DNA ของเชื้อ *Mycoplasma haemofelis* ทำปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.11.1 ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.3.1 - 3.11.3.3 ใช้ DNA โคลน U3LTR เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แล้วนำผลผลิต

ไปทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9 ว่าพบแถบ DNA จากปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อ FeLV Provirus หรือไม่

### 3.11.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA

นำ DNA จากตัวอย่างเลือดแมว จำนวน 122 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.11.1 ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.3.1 - 3.11.3.3 เติม DNA ความเข้มข้น 20 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l ใช้ DNA โคลน U3LTR เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แล้วนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9 และตรวจสอบด้วยสี SYBR green I อ่านผลด้วยตาเปล่า โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.11.4

## 3.12 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA

นอกจากการพัฒนาเทคนิค RPA ในการตรวจหาเชื้อ FeLV งานวิจัยนี้ยังสนใจพัฒนาเทคนิค Nested RPA เพื่อเปรียบเทียบความไว และความจำเพาะ กับเทคนิค RPA และ เทคนิค Nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus

### 3.12.1 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA

เตรียมปฏิกิริยา RPA ด้วยชุดน้ำยา TwistDx™ Basic kit ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Nested PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.10 ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l ผลผลิต RPA ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 เท่า ปริมาตร 2  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 13.6  $\mu$ l แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดไปมา 8 - 10 ครั้ง Spin down แล้วบ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ ความเข้มข้นของไพรเมอร์

อุณหภูมิ และ เวลา เตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9 โดยมีผลผลิตขนาด 101 bp

#### 3.12.1.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 ทดสอบไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 7.5 และ 5  $\mu$ M ปริมาณ 1.2  $\mu$ l บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9

#### 3.12.1.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.1 บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9

#### 3.12.1.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.1 บ่มใน Heat block ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.2 บ่มที่เวลาต่างๆดังนี้ 10, 20 และ 30 นาที แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9

#### 3.12.1.4 การทดสอบหาปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิ ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.1 ผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1, 2 และ 3  $\mu$ l บ่มใน Heat block ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.2 และใช้เวลาบ่มที่

เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.3 แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9

#### 3.12.1.5 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดของผลผลิต RPA ปฐมภูมิ

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.1 ผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-10}$  ตามลำดับ ที่ปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.4 บ่มใน Heat block ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.2 และใช้เวลาบ่มที่เหมาะสมจากข้อ 3.12.1.3 แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9

3.12.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค Nested RPA

นำผลผลิต RPA มาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 300X, 200X, 100X, 75X, 50X และ 25X ปริมาตร 2  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน อ่านผลด้วยตาเปล่าทันที การอ่านผลผลบวกจะเห็นสีเขียว ผลลบจะเห็นสีส้ม

3.12.3 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA

นำผลผลิต RPA ที่ให้ผลลบจากการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ในข้อ 3.11.7 มาทำปฏิกิริยา Nested RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.12.1 โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ อุณหภูมิ เวลา และ ปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิ ที่เหมาะสม จากข้อ 3.12.1.1-3.12.1.4 แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% ดังข้อ 3.9 และ สี SYBR green I อ่านผลด้วยตาเปล่า และใช้ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมดังข้อ 3.12.2



### 3.13 การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ One-Step

ตรวจหา FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัวอย่าง โดยทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AccessQuick™ RT-PCR System (Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV เช่นเดียวกับในข้อ 3.8 เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25  $\mu$ l ประกอบด้วย Master Mix ปริมาตร 12.5  $\mu$ l ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 pmole/ $\mu$ l ปริมาตรเส้นละ 0.75  $\mu$ l RNA จากข้อ 3.4 ปริมาตร 1.5  $\mu$ l น้ำยา AMV 0.5  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9  $\mu$ l ทำปฏิกิริยาที่สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 65 องศาเซลเซียส 1 นาที 73 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และที่ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม TECHNE จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9 โดยให้ผลผลิตขนาด 145 bp

### 3.14 การตรวจหา FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

#### 3.14.1 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA ด้วยชุดน้ำยา TwistDx Basic RT kit ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV เช่นเดียวกับข้อ 3.8 ความเข้มข้น 10  $\mu$ M ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l RNA ควบคุมบวกจากข้อ 3.7 ความเข้มข้น 10 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l น้ำยา RNase Inhibitor ความเข้มข้น 0.4 U/ $\mu$ l ปริมาตร 2.5  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9.7  $\mu$ l แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลดไปมา 8 - 10 ครั้ง Spin down แล้วบ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลา เตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9 โดยให้ผลผลิตขนาด 145 bp

### 3.14.1.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.14.1 ทดสอบไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu$ M บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเตรียมผลผลิต RPA ให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 และตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

### 3.14.1.2 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.14.1 โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.14.1.1 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้ 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับข้อ 3.11.2 และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

### 3.14.1.3 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ดังข้อ 3.14.1 โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมดังข้อ 3.14.1.2 จากนั้นนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับข้อ 3.11.2 และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

3.14.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยเทคนิค RT-RPA

นำผลผลิต RPA มาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 240X, 160X, 80X และ 40X ปริมาตร 2  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน อ่านผลด้วยตาเปล่าทันที การอ่านผลผลบวกจะเห็นสีเขียว ผลลบจะเห็นสีส้ม

3.14.3 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

เจือจาง RNA ที่เตรียมจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวดังในข้อ 3.7 ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา RT-RPA ดังข้อ 3.14.1 ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ เวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมดังข้อ 3.14.1.1-3.14.1.3 ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบจากนั้นนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9

#### 3.14.4 การตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA

นำ RNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดแมว จำนวน 122 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ดังข้อ 3.14.1 ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ เวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมดังข้อ 3.14.1.1-3.14.1.3 ใช้ RNA ที่เตรียมจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวดังข้อ 3.7 เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แล้วนำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.11.2 แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ดังข้อ 3.9 และ สี SYBR green I อ่านผลด้วยตาเปล่า โดยใช้ SYBR green I ปริมาตร 2  $\mu$ l ที่ความเข้มข้นจากข้อ 3.14.2

#### 3.15 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value: NPV) ของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA และ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

คำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม MEDCALC® ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)) จากสูตรการคำนวณดังนี้ (78)

$$\text{ความไว} = A / (A+C)$$

$$\text{ความจำเพาะ} = D / (B+D)$$

$$\text{ค่าทำนายผลบวก (PPV)} = A / (A+B)$$

$$\text{ค่าทำนายผลลบ (NPV)} = D / (C+D)$$

โดยเปรียบเทียบระหว่าง (1) เทคนิค RPA และ PCR (2) เทคนิค Nested RPA และ Nested PCR (3) วิเคราะห์ผลร่วมระหว่างเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และ PCR ร่วมกับ Nested PCR (4) เทคนิค RT-RPA และ RT-PCR (5) เทคนิค RT-RPA และ เทคนิค Rapid immunochromatographic assay ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 - 8

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR

ผลการตรวจ	ผลผลิตจากเทคนิค PCR ที่ให้ผลเป็นบวก	ผลผลิตจากเทคนิค PCR ที่ให้ผลเป็นลบ
ผลผลิตจากเทคนิค RPA ที่ให้ผลเป็นบวก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True positive (A)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False positive (B)
ผลผลิตจากเทคนิค RPA ที่ให้ผลเป็นลบ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False negative (C)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True negative (D)

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค Nested RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR

ผลการตรวจ	ผลผลิตจากเทคนิค Nested PCR ที่ให้ผลเป็นบวก	ผลผลิตจากเทคนิค Nested PCR ที่ให้ผลเป็นลบ
ผลผลิตจากเทคนิค Nested RPA ที่ให้ผลเป็นบวก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True positive (A)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False positive (B)
ผลผลิตจากเทคนิค Nested RPA ที่ให้ผลเป็นลบ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False negative (C)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True negative (D)

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ร่วมระหว่างเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

ผลการตรวจ	ผลผลิตจากเทคนิค PCR และ Nested PCR ที่ให้ผลเป็นบวก	ผลผลิตจากเทคนิค PCR และ Nested PCR ที่ให้ผลเป็นลบ
ผลผลิตจากเทคนิค RPA และ Nested RPA ที่ให้ผลเป็นบวก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True positive (A)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False positive (B)
ผลผลิตจากเทคนิค RPA และ Nested RPA ที่ให้ผลเป็นลบ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False negative (C)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True negative (D)

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR

ผลการตรวจ	ผลผลิตจากเทคนิค RT-PCR ที่ให้ผลเป็นบวก	ผลผลิตจากเทคนิค RT-PCR ที่ให้ผลเป็นลบ
ผลผลิตจากเทคนิค RT-RPA ที่ให้ผลเป็นบวก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True positive (A)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False positive (B)
ผลผลิตจากเทคนิค RT-RPA ที่ให้ผลเป็นลบ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False negative (C)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True negative (D)

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-RPA แล้ววิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Rapid immunochromatographic assay

ผลการตรวจ	Rapid immunochromatographic assay ที่ให้ผลเป็นบวก	Rapid immunochromatographic assay ที่ให้ผลเป็นลบ
ผลผลิตจากเทคนิค RT-RPA ที่ให้ผลเป็นบวก	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True positive (A)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False positive (B)
ผลผลิตจากเทคนิค RT-RPA ที่ให้ผลเป็นลบ	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล False negative (C)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผล True negative (D)

### 3.16 การคำนวณหาค่าความสอดคล้องกันของผลการตรวจโดยใช้ค่าสถิติ Kappa

ทำการวิเคราะห์ความสอดคล้องกันของผลการตรวจระหว่างเทคนิค RPA และ PCR, RPA ร่วมกับ Nested RPA และ PCR ร่วมกับ Nested PCR, RT-RPA และ RT-PCR, RT-RPA และ Rapid immunochromatographic assay เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I โดยใช้ค่าสถิติ Kappa ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>) ดังตารางที่ 9 และ 10 โดยค่าที่ได้จะมีค่าระหว่าง 0 – 1 และประเมินความสอดคล้องกันด้วยเกณฑ์ดังต่อไปนี้ตามแนวทางของ Landis และ Koch (79)

น้อยกว่า 0	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)
0 – 0.20	มีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (Slight)
0.21 – 0.40	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์พอใช้ (Fair)
0.41 – 0.60	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง (Moderate)
0.61 – 0.80	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (Substantial)
0.81 – 1	มีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (Almost perfect)

โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$K = \frac{P_a - P_e}{1 - P_e}$$

$$P_a = \left[ \frac{A}{A+B+C+D} \right] + \left[ \frac{D}{A+B+C+D} \right]$$

$$P_e = \left[ \frac{A+C}{A+B+C+D} \frac{A+B}{A+B+C+D} \right] + \left[ \frac{B+D}{A+B+C+D} \frac{C+D}{A+B+C+D} \right]$$

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Nested PCR เพื่อหาความสอดคล้องกันของผลการตรวจ ด้วยค่าสถิติ Kappa

ผลการตรวจ	จากเทคนิค RPA และ Nested RPA	จากเทคนิค RPA และ Nested RPA	ผลรวม
จากเทคนิค PCR และ Nested PCR	ผลบวก / ผลบวก (A)	ผลบวก / ผลลบ (B)	(A + B)
จากเทคนิค PCR และ Nested PCR	ผลลบ / ผลบวก (C)	ผลลบ / ผลลบ (D)	(C+D)
ผลรวม	(A + C)	(B + D)	(A + B + C + D)

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay เพื่อหาความสอดคล้องกันของผลการตรวจ ด้วยค่าสถิติ Kappa

ผลการตรวจ	จากเทคนิค RT-RPA	จากเทคนิค RT-RPA	ผลรวม
จากเทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay	ผลบวก / ผลบวก (A)	ผลบวก / ผลลบ (B)	(A + B)
จากเทคนิค RT-PCR และ Rapid immunochromatographic assay	ผลลบ / ผลบวก (C)	ผลลบ / ผลลบ (D)	(C+D)
ผลรวม	(A + C)	(B + D)	(A + B + C + D)

## บทที่ 4

### ผลการดำเนินการวิจัย

#### 1. ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดจากแมวที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์ความเป็นเลิศด้านโรคแมวและคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 122 ตัว โดยแบ่งเป็นแมวที่ป่วยด้วยกลุ่มอาการที่มีเนื้องอกหรือป่วยด้วยโรคมะเร็ง จำนวน 56 ตัว คิดเป็นร้อยละ 45.90 กลุ่มที่พบความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลืองจำนวน 10 ตัว คิดเป็นร้อยละ 8.20 กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV โรคติดเชื้ออื่นๆ ที่สำคัญในแมว จำนวน 17 ตัว คิดเป็นร้อยละ 13.93 กลุ่มที่ป่วยเรื้อรังและยังไม่สามารถหาสาเหตุของโรคได้จำนวน 25 ตัว คิดเป็นร้อยละ 20.49 และกลุ่มที่มารับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวและตรวจสุขภาพจำนวน 14 ตัว คิดเป็นร้อยละ 11.48 ดังตารางที่ 11

#### 2. การตรวจหา Viral RNA (p27 Antigen) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

นำเลือดที่เจาะเก็บจากแมวที่คาดว่าจะติดเชื้อ FeLV และแมวที่คาดว่าจะตรวจไม่พบเชื้อ FeLV จำนวน 122 ตัว มาตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag Test Kit เพื่อดูว่าแมวมีการติดเชื้อแบบ Progressive infection หรือไม่ พบว่าให้ผลบวก 63 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 59 ตัวอย่าง ดังนั้นการตรวจหา Viral RNA (p27 Antigen) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป พบตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection จำนวน 63 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างเลือดแมวที่ไม่น่าจะติดเชื้อ FeLV หรือ เป็น Abortive infection หรือ เป็น regressive infection จำนวน 59 ตัวอย่าง



ตารางที่ 11 แสดงจำนวนตัวอย่างเลือดแมวจากแมวที่แสดงอาการป่วยทางคลินิก แมวที่มาเข้ารับการตรวจสุขภาพ และรับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหัดแมวเม็ดเลือดขาวในแมว

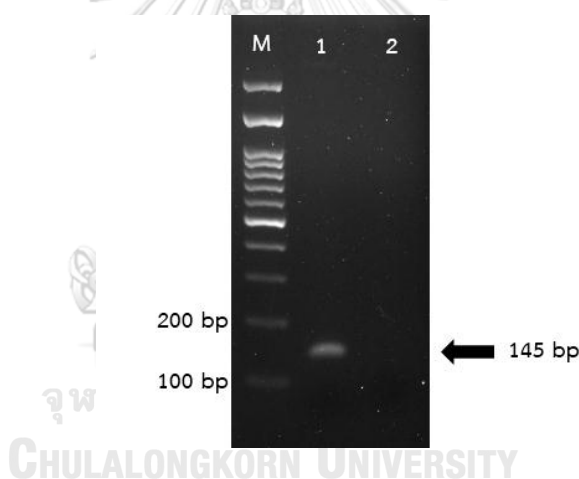
กลุ่มอาการทางคลินิก หรือสาเหตุการป่วยของแมว	จำนวน (ตัว)	ร้อยละ
1. กลุ่มที่มีเนื้องอกหรือป่วยด้วยโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว	56	45.90
2. กลุ่มที่พบความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลือง	10	8.20
3. กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อไวรัส FIV และโรคติดเชื้ออื่นๆ ได้แก่ FHV, FCV, FIP และ <i>Mycoplasma haemofelis</i>	17	13.93
4. กลุ่มที่ป่วยโรคเรื้อรัง เช่น โรคไต โรคหัวใจ โรคผิวหนัง โรคความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ รวมถึงแมวที่ป่วยและยังไม่สามารถระบุสาเหตุของโรคได้ เช่น น้ำหนักลด ซึม เบื่ออาหาร	25	20.49
5. กลุ่มที่มารับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหัดแมวเม็ดเลือดขาวและตรวจสุขภาพ	14	11.48
รวม	122	100.00

### 3. การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือดแมว

สกัด DNA และ RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® cadior® Pathogen จากตัวอย่างเลือดแมว 122 ตัวอย่าง อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ที่  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ในช่วง 1.7 – 1.9 คือ DNA มีคุณภาพดี จำนวน 9 ตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสง >1.9 คือมี RNA ปนเปื้อนหรือใช้สารละลายสำหรับสอบเทียบไม่เหมาะสม จำนวน 80 ตัวอย่าง และ ค่าการดูดกลืนแสง <1.7 คือมีปริมาณ DNA น้อยหรืออาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน จำนวน 33 ตัวอย่าง อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ในช่วง 1.9 – 2.1 คือ RNA มีคุณภาพดี จำนวน 51 ตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสง >2.1 คืออาจใช้สารละลายสำหรับสอบเทียบที่ไม่เหมาะสม จำนวน 29 ตัวอย่าง และ ค่าการดูดกลืนแสง < 1.9 คือมีปริมาณ RNA น้อยหรืออาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน จำนวน 42 ตัวอย่าง นำตัวอย่าง DNA และ RNA ที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ FeLV Provirus และ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่อไป

#### 4. การโคลนยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus

โคลนยีนบริเวณ U3LTR ของ FeLV Provirus ขนาด 145 bp เข้าสู่พลาสมิด pGEMT<sup>®</sup>-T Easy Vector และ ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี Transformation เนื่องจากต้องใช้ DNA ของเชื้อ FeLV Provirus ในปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และเป็นตัวควบคุมบวกในการตรวจหา FeLV Provirus ผลการตรวจสอบโคลน U3LTR ด้วยวิธี PCR พบผลผลิตขนาด 145 bp ดังภาพที่ 6 และผลการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน Feline leukemia virus LTR, partial sequence (Accession number: FJ476268) ยืนยันว่าโคลนที่ได้เป็นยีน U3LTR ของ FeLV Provirus

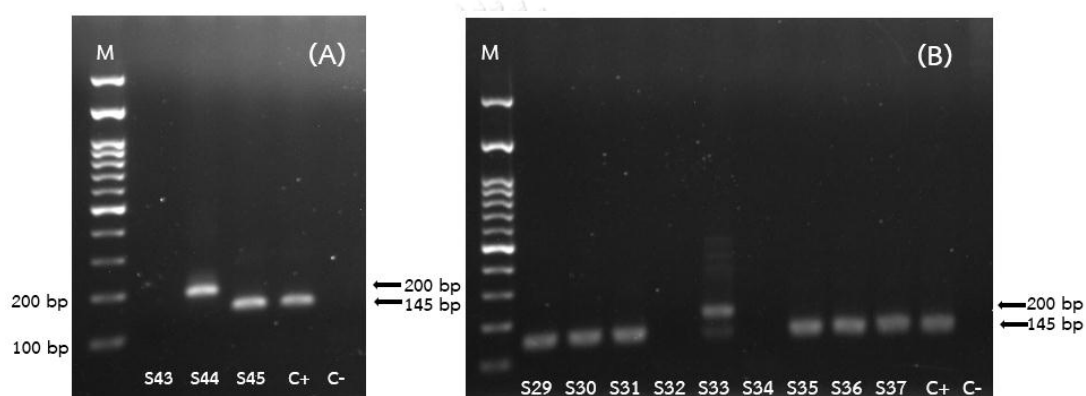


ภาพที่ 6 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิต RPA ในวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 %; M คือ 100 bp DNA ladder เลขที่ 1 คือ โคลน U3LTR และเลขที่ 2 คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

#### 5. การตรวจหา FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจาก FeLV Provirus สามารถตรวจพบได้ทั้งในแมวที่มีการติดเชื้อแบบ Progressive infection และ Regressive infection ดังนั้นแมวที่ให้ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปเป็นลบ จึงอาจเป็นแมวที่ไม่ติดเชื้อ FeLV หรือติดเชื้อแบบ Abortive infection หรือ Regressive infection การตรวจหา FeLV Provirus เป็นวิธีที่ใช้ตรวจยืนยันการติดเชื้อแบบ Regressive infection หรือ latent infection การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR กับ DNA ที่สกัด

จากแผนที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV และใช้ DNA โคลน U3LTR เป็นหลอดควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 61 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตขนาด 145 bp ตามที่คาดหวังไว้ อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp และมีตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตทั้ง 2 ขนาด คือ 145 bp และประมาณ 200 bp ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% (A) แสดงผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S44 และ S45 (B) แสดงผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S33; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ

เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 200 bp เป็นบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV Provirus หรือไม่ จึงทำการตัดวุ้นอะกาโรสที่บริเวณตำแหน่งดังกล่าวใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (Microtube) แล้วเติมน้ำยา NTI จากชุดน้ำยาในข้อ 3.6.1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาดังข้อ 3.6.1 แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน Feline leukemia virus, LTR complete sequence (Accession number: AY374189) พบว่าตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่าง เหมือนกัน 100% และ เป็นยีน U3LTR ของ exogenous FeLV Provirus

ดังนั้น ผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR พบผลบวกทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง และ ผลลบทั้งสิ้น 49 ตัวอย่าง ดังผลสรุปในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลสรุปการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัวอย่าง

ผลการตรวจ	จำนวน	รวม (122)
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 145 bp	61	73
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 200 bp	10	
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 145 และ 200 bp	2	
ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	49	49

#### 6. การเปรียบเทียบผลการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assay กับ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR

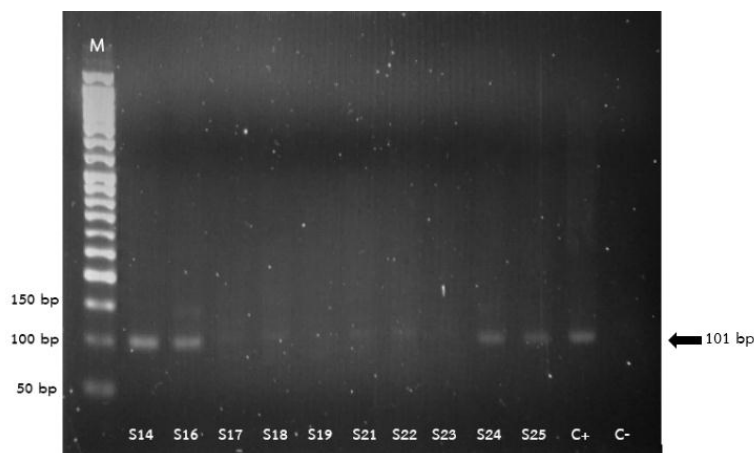
พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Rapid immunochromatographic assay จำนวน 63 ตัวอย่าง ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR ทั้งหมด ขณะที่จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay จำนวน 59 ตัวอย่าง ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR จำนวน 49 ตัวอย่าง และ ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนั้น ตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection และ Regressive infection มีจำนวน 73 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะไม่ติดเชื้อ FeLV หรือ เป็น Abortive infection มีจำนวน 49 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างเลือดแมวที่ให้ผลลบเป็นตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อ FeLV จึงทำการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR ด้วย

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus เทคนิค PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	63	0	63
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	10	49	59
รวม	73	49	122

#### 7. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR

เนื่องจากมีงานวิจัยที่พบว่า การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าเทคนิค PCR (76) จึงได้ทำการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR ด้วย โดยนำผลผลิต PCR ปฐมภูมิ (Primary PCR) ของตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จำนวน 49 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ U3LTR ด้วยเทคนิค Nested PCR โดยใช้ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และผลผลิต PCR ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ นำผลผลิตไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% พบผลผลิต Nested PCR ตามขนาดที่คาดหวัง คือ 101 bp ดังภาพที่ 8 โดยผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR ดังสรุปในตารางที่ 14 พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 17 ตัวอย่าง และให้ผลลบจำนวน 32 ตัวอย่าง



ภาพที่ 8 แสดงผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% พบผลผลิตขนาด 101 bp จากตัวอย่างหมายเลข S14 S16 S24 และ S25; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ

ตารางที่ 14 แสดงผลสรุปการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR จากตัวอย่างเลือดแมวที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay และเทคนิค PCR จำนวน 49 ตัวอย่าง

ผลการตรวจ	จำนวน
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 101 bp	17
ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	32
รวม	49

#### 8. การเปรียบเทียบผลการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assay กับ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay และ PCR มีทั้งสิ้น 63 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR อย่างเดียว จำนวน 10 ตัวอย่าง และ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Nested PCR อย่างเดียว จำนวน 17 ตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection หรือ Regressive

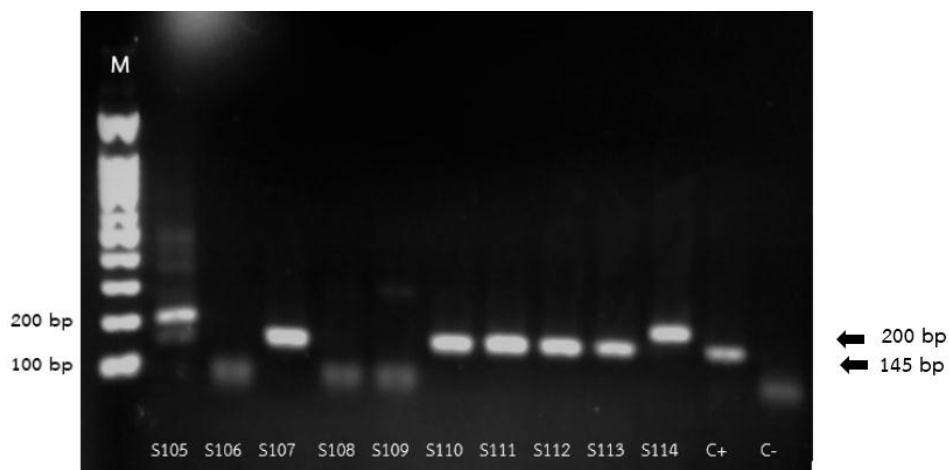
infection จึงมีจำนวนทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะไม่ติดเชื้อ FeLV หรือ เป็น Abortive infection มีจำนวน 32 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงผลสรุปของการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างรวมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR และ Nested PCR	จำนวนตัวอย่างรวมที่ให้ผลลบด้วยวิธี PCR และ Nested PCR	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Rapid immunochromatographic assay	(PCR) 63	0	63
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ ด้วยวิธี Rapid immunochromatographic Assay	(PCR) 10 (Nested PCR) 17	32	59
รวม	90	32	122

## 9. การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ One-Step

ทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AccessQuick™ RT-PCR System ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV เช่นเดียวกับการตรวจหา FeLV Provirus กับอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดแมว จำนวน 122 ตัวอย่าง โดยใช้ RNA ที่สกัดจาก FeLV Viral RNA ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสหัดเม็ดเลือดขาวเป็น RNA ควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ แล้วนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% โดยมีขนาดผลผลิตที่คาดหวังไว้คือ 145 bp อย่างไรก็ตามพบว่า มีผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp เกิดขึ้นในบางตัวอย่างเช่นเดียวกับ PCR ดังภาพที่ 9 พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกขนาด 145 bp มีจำนวน 53 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกขนาด 200 bp มีจำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งขนาด 145 และ 200 bp มีจำนวน 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 16



ภาพที่ 9 แสดงผลผลิต RT-PCR บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ผลผลิตขนาด 200 bp และ 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S105 ผลผลิตขนาด 200 bp จากตัวอย่างเลขที่ S114 และผลผลิตขนาด 145 bp จากตัวอย่างเลขที่ S107 และ S110 – S113; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ RNA ที่สกัดจาก FeLV Viral RNA ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 16 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบ ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการตรวจ	จำนวน	รวม (122)
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 145 bp	53	64
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 200 bp	7	
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RT-PCR ขนาด 145 และ 200 bp	4	
ตัวอย่างที่ให้ผลลบ	58	58

10. การเปรียบเทียบผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และ การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR กับ Rapid Immunochromatographic Assay

พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยเทคนิค RT-PCR มีมากกว่าจำนวนตัวอย่างให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยวิธี Rapid immunochromatographic assay 1 ตัวอย่าง โดยที่



ตัวอย่างดังกล่าว ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 17 ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลการตรวจร่วมกับเทคนิค PCR และ Nested PCR ตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection มีจำนวน 64 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Regressive infection มีจำนวน 26 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างเลือดแมวที่ไม่น่าจะติดเชื้อ FeLV หรือเป็น Abortive infection มีจำนวน 32 ตัวอย่าง

ตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assays เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-PCR	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-PCR	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	63	0	63
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	1	58	59
รวม	64	58	122

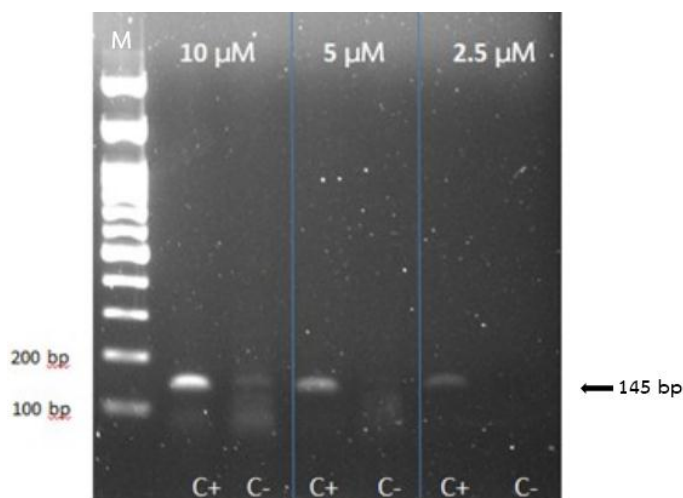
## 11. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

ส่วนผสมในปฏิกิริยาของเทคนิค RPA ประกอบไปด้วย ไพร์เมอร์เช่นเดียวกันกับที่ใช้ในเทคนิค PCR ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l DNA โคลน U3LTR เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก ความเข้มข้น 20 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 1  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 12.2  $\mu$ l ส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu$ l ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu$ l บ่มใน Heat block โดยทำการทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค RPA ได้แก่ ความเข้มข้นของไพร์เมอร์ อุณหภูมิ และเวลา

### 11.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RPA

เตรียมปฏิกิริยา RPA โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu$ M ทดสอบกับ DNA โคลน U3LTR ความเข้มข้น 20 ng/ $\mu$ l โดยใช้ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20

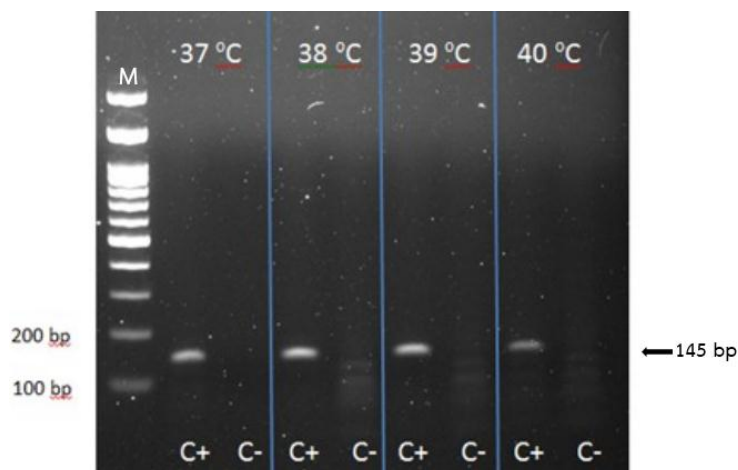
นาที่ ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% โดยผลผลิต RPA ที่ได้มีขนาด 145 bp พบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาที่ 5  $\mu\text{M}$  มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลุดควบคุมลบพบแถบ DNA ของไพรเมอร์ได้ เมอร์น้อยกว่าที่ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10  $\mu\text{M}$  ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu\text{M}$  บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลุดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลุดควบคุมลบ

## 11.2 การทดสอบหาภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RPA

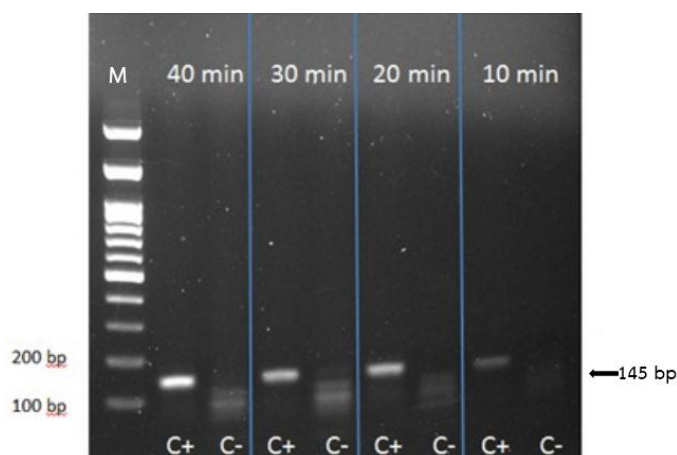
เตรียมปฏิกิริยา RPA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 5  $\mu\text{M}$  ทดสอบกับ DNA โคลน U3LTR ความเข้มข้น 20 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ ดังนี้ 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำผลผลิต RPA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RPA คือ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลุดควบคุมลบพบแถบ DNA ของไพรเมอร์ได้เมอร์น้อยกว่าที่อุณหภูมิอื่น ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ที่อุณหภูมิในการบ่มที่ 37, 38, 39 และ 40 องศาเซลเซียส บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

### 11.3 การทดสอบหาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RPA ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา RPA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 5  $\mu\text{M}$  ทดสอบกับดีเอ็นเอโคลน U3LTR ความเข้มข้น 20 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 นาที แล้วทำผลผลิต RPA ที่ได้ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่าเวลาในการบ่มปฏิกิริยา RPA ที่เหมาะสมที่สุดคือ 20 นาที เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลอดควบคุมลบพบแถบ DNA ของไพรเมอร์เดเมอร์ที่น้อยกว่าเวลาบ่ม 30 และ 40 นาที ดังแสดงในภาพที่ 12

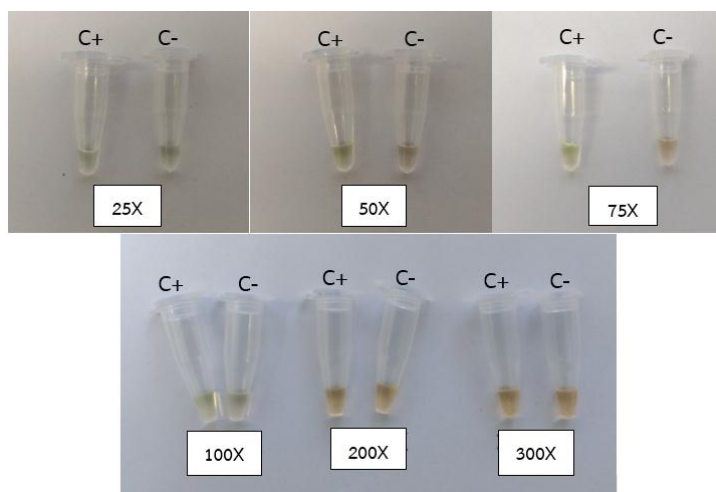


ภาพที่ 12 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ที่ใช้เวลาในการบ่มที่ 40, 30, 20 และ 10 นาที บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

จากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหา FeLV Proviral ด้วยเทคนิค RPA สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu\text{M}$  ปริมาณ 2.4  $\mu\text{l}$  น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu\text{l}$  DNA ที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 1  $\mu\text{l}$  น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 12.2  $\mu\text{l}$  และ Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 11.4 การทดสอบความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ผล RPA

เตรียมปฏิกิริยา RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu\text{l}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำผลผลิต RPA มาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 25X 50X 75X 100X 200X และ 300X พบว่าความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ให้ความแตกต่างระหว่างผลบวกกับผลลบที่ชัดเจนที่สุดคือที่ความเข้มข้น 75X ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบผลผลิต ด้วยสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 25X 50X 75X 100X 200X และ 300X ; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ

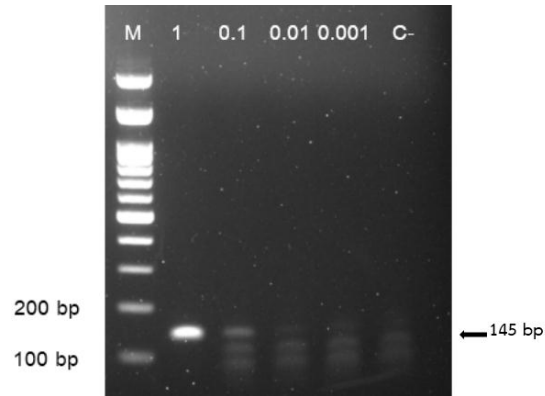
### 11.5 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

การทดสอบปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยเจือจาง DNA โคลน U3LTR ที่ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา RPA จากนั้นตรวจสอบผลผลิต RPA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่าปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหา FeLV Provirus ได้ คือ 1 ng/ $\mu$ l ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1 ng/ $\mu$ l พบแต่แถบ DNA ที่จางกว่าและเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l พบแต่แถบ DNA จางๆ ของไพรเมอร์ไดเมอร์เช่นเดียวกันกับในหลอดควบคุมลบ ดังแสดงในภาพที่ 14

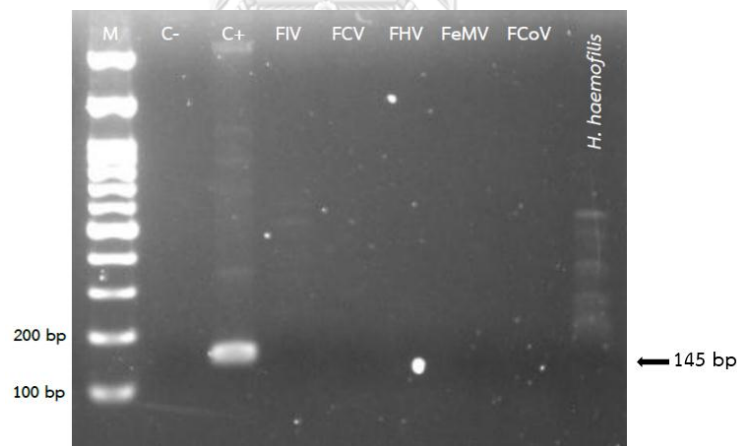
### 11.6 การทดสอบความจำเพาะของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA

นำ DNA และ cDNA ของไวรัสชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อไวรัสในแมว ได้แก่ Feline calicivirus (FCV), Feline immunodeficiency virus (FIV), Feline coronavirus (FCoV), Feline herpesvirus (FHV) และ Feline morbillivirus (FeMV) รวมถึงเชื้อ *Mycoplasma haemofelis* (*M. haemofelis*) ทำปฏิกิริยา RPA และตรวจสอบผลผลิต RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้

กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ปรากฏว่าไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่สำคัญในแมว ดังแสดงในภาพที่ 15



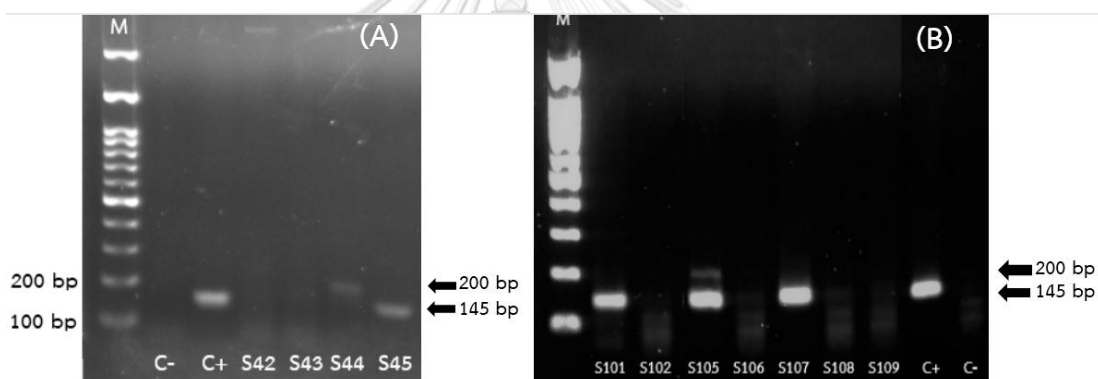
ภาพที่ 14 แสดงการทดสอบปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ; M คือ 100 bp DNA ladder ; เลขที่ 1-4 คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus ความเข้มข้น 1-0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ และเลขที่ 5 คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ



ภาพที่ 15 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิต RPA ของเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ; M คือ 100 bp DNA ladder เลขที่ 1 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ เลขที่ 2 คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV provirus เป็นตัวควบคุมบวก เลขที่ 3 – 8 คือ เชื้อ FIV, FCV, FHV, FeMV, FCoV และ *H. haemofelis* ตามลำดับ

### 11.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

นำ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดแมวที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV จำนวน 122 ตัวอย่าง มาตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบแถบ DNA ที่มีขนาดผลผลิต 145 bp ตามที่คาดหวังไว้ จำนวน 58 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม พบว่ามีผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp จำนวน 8 ตัวอย่าง และพบผลผลิต RPA ทั้ง 2 ขนาด คือ 145 bp และ 200 bp จำนวน 4 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 16 ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA ให้ผลบวกจำนวน 70 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 52 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 18



ภาพที่ 16 (A) แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S42 - S45 S109 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ โดยผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลขที่ S44 มีขนาดประมาณ 200 bp และตัวอย่างเลขที่ S45 มีขนาด 145 bp (B) แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S101 S102 และ S105 - S109 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ โดยผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลขที่ S105 มีขนาดผลผลิตทั้งขนาดประมาณ 200 bp และ 145 bp ตัวอย่างเลขที่ S101 และ S107 มีผลผลิตขนาด 145 bp

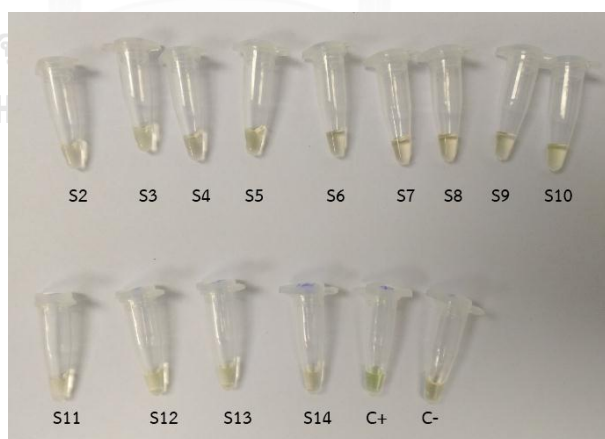


ตารางที่ 18 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมวด้วยเทคนิค RPA วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส จำนวน 122 ตัวอย่าง

ผลการตรวจ	จำนวน	รวม (122)
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RPA ขนาด 145 bp	58	70
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RPA ขนาด 200 bp	8	
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RPA ขนาด 145 และ 200 bp	4	
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ	52	52

### 11.8 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และ วิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I

นำผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลือดแมวมาตรวจสอบด้วยตาเปล่า โดยใช้สี SYBR green I ความเข้มข้น 75X พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะมีสีเขียวอ่อน ขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะมีสีส้มจางๆ ดังแสดงในภาพที่ 17 ผลการทดสอบผลผลิต RPA จากตัวอย่างเลือดแมว จำนวน 122 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกจำนวน 62 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 60 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 19



ภาพที่ 17 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RPA และ วิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S2 ถึง S14; C+ คือ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ



ตารางที่ 19 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

ผลการตรวจ	จำนวน
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	62
ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	60
รวม	122

### 11.9 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค PCR

การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA เทียบกับ เทคนิค PCR และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่าเทคนิค RPA ให้ผลลบลง 3 ตัวอย่าง ส่วนการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I พบว่าเทคนิค RPA ให้ผลลบลง 11 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 20 และ 21 โดยค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 95.89 (95% CI 88.46% - 99.14%) ความจำเพาะร้อยละ 100.00 (95% CI 92.89% - 100.00%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 100.00 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 94.23 (95% CI 84.36% - 98.02%) และค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 84.93 (95% CI 74.64% - 92.23%) ความจำเพาะร้อยละ 100.00 (95% CI 92.75% - 100.00%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 100.00 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 81.67 (95% CI 72.10% - 88.48%) จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA มีความจำเพาะไม่แตกต่างกับเทคนิค PCR

ทำการทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และเทคนิค PCR เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.949$ : CI 0.893 - 1.000 ทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก (มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81 - 1.00) และเมื่อทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I และเทคนิค PCR ค่าสถิติ kappa (k) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ

95 ค่า  $k = 0.819$ : CI 0.719 – 0.919 ทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมากเช่นกัน (มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81 – 1.00)

ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RPA gel electrophoresis	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RPA gel electrophoresis	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR	70	3	73
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR	0	49	49
รวม	70	52	122

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RPA-SYBR green I	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RPA-SYBR green I	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR	62	11	73
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR	0	49	49
รวม	62	60	122

#### 11.10 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% และ SYBR green I พบว่าการวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I มีผลลบลงจำนวน 8 ตัวอย่าง แต่ไม่พบผลบวกลง ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยเปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% กับการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

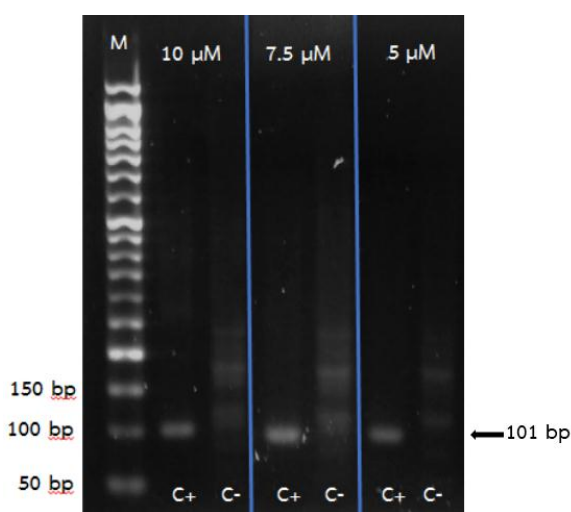
วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	62	8	70
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	0	52	52
รวม	62	60	122

## 12. การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA

เนื่องจากต้องการเพิ่มความไว และความจำเพาะ เช่นเดียวกันกับการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR จึงได้ทำการพัฒนาเทคนิค Nested RPA เพื่อตรวจหา FeLV Provirus โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาของเทคนิค Nested RPA ประกอบไปด้วย ไพริเมอร์เช่นเดียวกับที่ใช้ในเทคนิค Nested PCR ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu$ l ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu$ l บ่มใน Heat block ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค Nested RPA ได้แก่ ความเข้มข้นของไพริเมอร์ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณผลผลิตของ RPA ปฐมภูมิที่เหมาะสม จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% โดยผลผลิต RPA ที่ได้มีขนาด 101 bp

### 12.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA

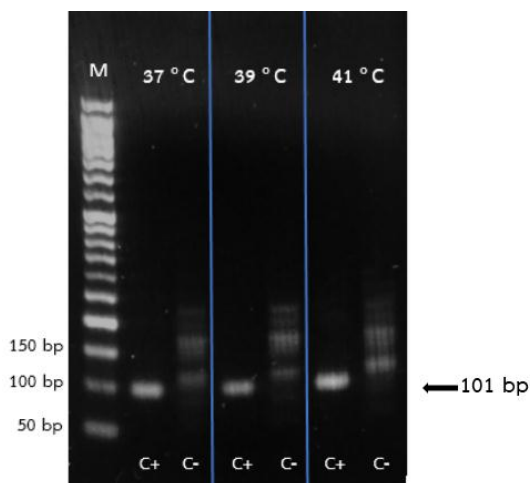
ใช้ไพรเมอร์ Nested RPA เช่นเดียวกันกับที่ใช้ในเทคนิค Nested PCR ที่ความเข้มข้น 10, 7.5 และ 5  $\mu\text{M}$  ทดสอบกับผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ที่เจือจาง 10 เท่า บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาที่ 7.5  $\mu\text{M}$  มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้แถบ DNA ของตัวควบคุมบวกที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก ตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 7.5 และ 5  $\mu\text{M}$  ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

### 12.2 การทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA

เตรียมปฏิกิริยา Nested RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 7.5  $\mu\text{M}$  ทดสอบกับผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ที่เจือจาง 10 เท่า บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส 39 และ 41 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 20 นาที พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RPA คือ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้แถบ DNA ของตัวควบคุมบวกที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก ตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 37, 39 และ 41 องศาเซลเซียส ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

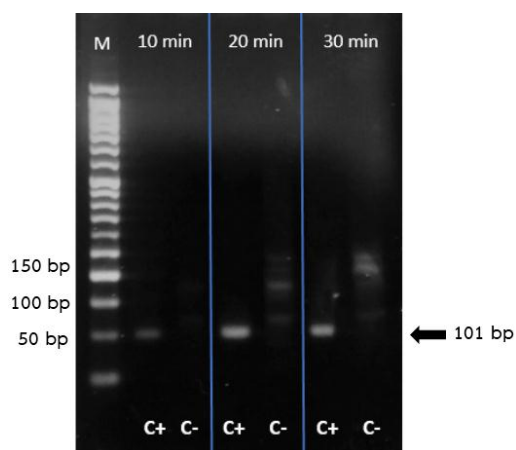
### 12.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA

เตรียมปฏิกิริยา Nested RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 7.5  $\mu$ M ทดสอบกับผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ที่เจือจาง 10 เท่า บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที พบว่าเวลาในการบ่มปฏิกิริยา RPA ที่เหมาะสมที่สุดคือ 10 นาที เนื่องจากให้แถบ DNA ของตัวควบคุมบวกที่ชัดเจน และพบไพรเมอร์ไดเมอร์ของตัวควบคุมลบน้อยกว่าที่เวลา 20 นาที ดังแสดงในภาพที่ 20

### 12.4 การทดสอบหาปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA

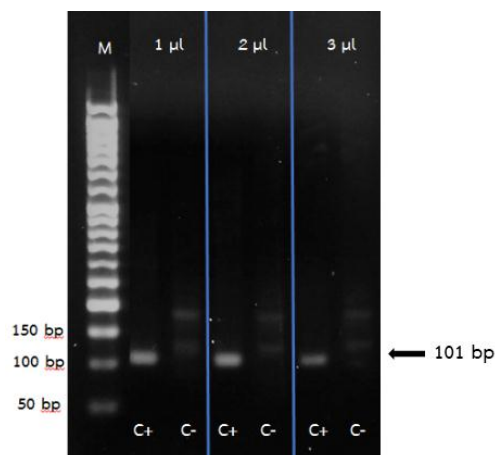
เตรียมปฏิกิริยา Nested RPA โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 7.5  $\mu$ M บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำปฏิกิริยากับผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1, 2 และ 3  $\mu$ l พบว่าปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิ ที่เจือจาง 10

เท่า ปริมาตร 2  $\mu$ l มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้แถบ DNA ของตัวควบคุมบวกที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 20 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% โดยใช้เวลาในการบ่มที่ 10, 20 และ 30 นาที ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

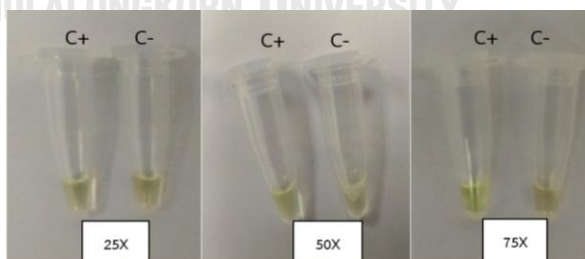
สรุปสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA ปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ได้ดังนี้ ความเข้มข้นของไพรเมอร์คือ 7.5  $\mu$ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และใช้ผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2  $\mu$ l



ภาพที่ 21 แสดงแถบ DNA ที่ได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา Nested RPA ของผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1, 2 และ 3  $\mu\text{l}$  ของตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

### 12.5 การทดสอบความเข้มข้นของ สี SYBR green I

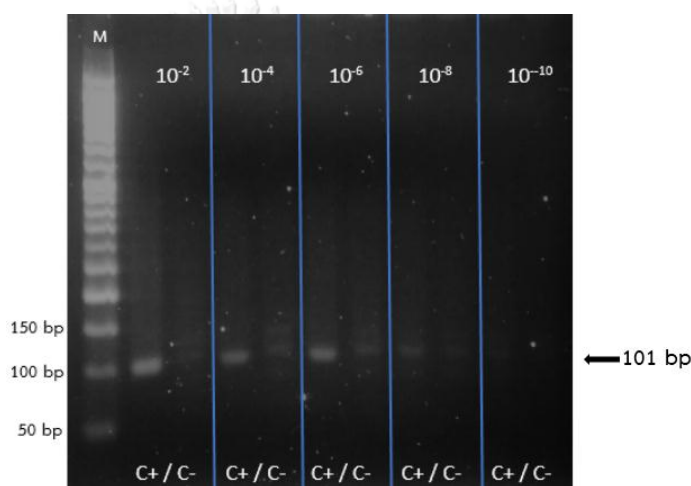
นำผลผลิต Nested RPA มาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้น 75X 50X และ 25X พบว่าความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ให้ความแตกต่างระหว่างผลบวกกับผลลบที่ชัดเจนที่สุดคือที่ความเข้มข้น 75X เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ผล RPA ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แสดงผลการตรวจหา FeLV Proviral ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 25X 50X และ 75X ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

## 12.6 การทดสอบขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA

การทดสอบปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA โดยเจือจางผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus ที่ความเข้มข้น  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-10}$  ตามลำดับ และใช้ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา Nested RPA จากนั้นตรวจสอบผลผลิต RPA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% พบว่าสามารถตรวจปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิ ที่น้อยที่สุดที่  $10^{-6}$  ดังแสดงในภาพที่ 23



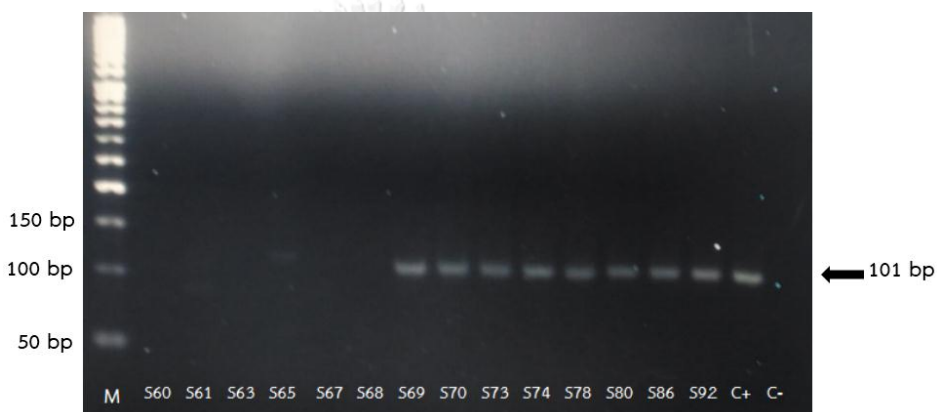
ภาพที่ 23 แสดงผลการทดสอบปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus ที่เจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-4}$   $10^{-6}$   $10^{-8}$  และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบที่เจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-4}$   $10^{-6}$   $10^{-8}$  ; M คือ 50 bp DNA ladder

จากภาพที่ 21 ในข้อ 12.4 จะเห็นได้ว่าผลผลิตจากเทคนิค Nested RPA ของตัวควบคุมลบ ซึ่งเจือจางผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่  $10^{-1}$  ยังคงพบแถบ DNA จางๆ ในขณะที่ผลผลิตจากเทคนิค Nested RPA ของตัวควบคุมลบ ซึ่งเจือจางผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่  $10^{-2}$  ไม่พบแถบ DNA ดังนั้นจึงสามารถสรุปสถานะที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อ FeLV provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA ปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ได้ดังนี้ ความเข้มข้นของไพรเมอร์คือ 7.5  $\mu$ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และใช้ผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 100 เท่า ปริมาตร 2  $\mu$ l



## 12.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

นำผลผลิต RPA ที่ให้ผลเป็นลบจากการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA จำนวน 52 ตัวอย่าง มาทำปฏิกิริยา Nested RPA แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% พบแถบ DNA ที่มีขนาดผลผลิต 101 bp ดังภาพที่ 24 พบว่า Nested RPA ให้ผลบวก จำนวน 20 ตัวอย่าง และ ให้ผลลบ จำนวน 32 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 23



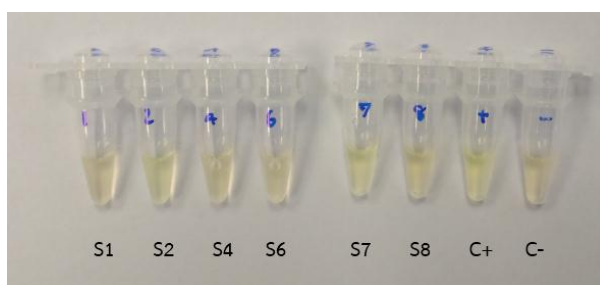
ภาพที่ 24 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Nested RPA ขนาด 101 bp จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S65 S69 S70 S73 S74 S78 S80 S86 และ S92 บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2% ; M คือ 50 bp DNA ladder ; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 23 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

ผลการตรวจ	จำนวน
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	20
ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	32
รวม	52

## 12.8 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยสี SYBR green I

เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยการตรวจสอบผลผลิต Nested RPA ด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I ความเข้มข้น 75X พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะมีสีเขียวอ่อนจำนวน 15 ตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะมีสีส้มจางๆ จำนวน 37 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 25 และในตารางที่ 24



ภาพที่ 25 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S1 S2 และ S4 ถึง S8; C+ คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของ DNA โคลน U3LTR ของ FeLV Provirus เป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ ผลผลิต RPA ปฐมภูมิของน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 24 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

ผลการตรวจ	จำนวน
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	15
ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	37
รวม	52

## 12.9 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค Nested RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% พบว่าการวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I มีผลลบลงจำนวน 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบผลบวกหลง ดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA โดยเปรียบเทียบ การตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 2% กับการ ตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผล บวกด้วยตาเปล่าโดยใช้ สี SYBR I	จำนวนตัวอย่างที่ ให้ผลลบด้วยตาเปล่า โดยใช้สี SYBR I	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วย การแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	15	5	20
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยการแยกขนาดภายใต้ กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	0	32	32
รวม	15	37	52

#### 12.10 การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และ วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR เทียบกับ เทคนิค RPA และ Nested RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่า เทคนิค RPA และ PCR ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 70 ตัวอย่าง และ เทคนิค Nested RPA และ Nested PCR ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 16 ตัวอย่าง เทคนิค Nested RPA และ เทคนิค PCR ให้ ผลบวกตรงกันจำนวน 3 ตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 89 ตัวอย่าง และทั้ง 4 วิธี ให้ผล บวกตรงกันจำนวน 31 ตัวอย่าง ขณะที่ Nested RPA ให้ผลลบลงจำนวน 1 ตัวอย่าง (อีก 3 วิธี ให้ ผลบวก) และ Nested RPA ให้ผลบวกลง จำนวน 1 ตัวอย่าง (อีก 3 วิธี ให้ผลลบ) การคำนวณหา ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วย เทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR ดังแสดง ในตารางที่ 26 โดยค่าทางสถิติของเทคนิค RPA ร่วมกับเทคนิค Nested RPA และตรวจสอบผลผลิต ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 98.89 (95% CI 93.96% - 99.97%) ความจำเพาะร้อยละ 96.88 (95% CI 83.78% - 99.92%) ค่าการทำนาย

ผลบวกร้อยละ 98.89 (95% CI 92.82% - 99.84%) และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 96.88 (95% CI 81.52% - 99.54%)

ทำการทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่า  $k = 0.958$ : CI 0.899 - 1.000 ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก (มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81 - 1.00)

ตารางที่ 26 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR	(PCR/ RPA) 70 (Nested PCR/ Nested RPA) 16 (Nested RPA) 3	(Nested RPA) 1	90
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR	(Nested RPA) 1	(PCR/ RPA/Nested PCR/ Nested RPA) 31	32
รวม	90	32	122

การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR เทียบกับ เทคนิค RPA และ Nested RPA และวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I พบว่าเทคนิค RPA-SYBR green I และ PCR ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 62 ตัวอย่าง และ เทคนิค Nested RPA-SYBR I และ Nested PCR ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 12 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 74 ตัวอย่าง และเทคนิค PCR ให้ผลบวก แต่ RPA SYBR green I ให้ผลลบจำนวน 11 ตัวอย่าง รวมถึงเทคนิค Nested PCR ให้ผลบวก แต่ Nested RPA-SYBR green I ให้ผลลบ จำนวน 5 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง ขณะที่ทั้ง 4 วิธี ให้ผลลบตรงกันจำนวน 31 ตัวอย่าง และ Nested RPA ให้ผลผลบวกตรง จำนวน 1 ตัวอย่าง (อีก 3 วิธี ให้ผลลบ) การคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่า

ทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA-SYBR green I ร่วมกับ Nested RPA-SYBR green I เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR ดังตารางที่ 27 โดยค่าทางสถิติของเทคนิค RPA-SYBR green I ร่วมกับเทคนิค Nested RPA-SYBR I เป็นดังนี้ ค่าความไวร้อยละ 82.22 (95% CI 72.74% - 89.48%) ความจำเพาะร้อยละ 96.88 (95% CI 83.78% - 99.92%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 98.67 (95% CI 91.47% - 99.80%) และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 65.96 (95% CI 55.30% - 75.21%)

ทำการทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA และเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR I เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.687$ : CI 0.555 - 0.820 ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดี (0.61 - 0.80)

ตารางที่ 27 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก ด้วยเทคนิค RPA-SYBR I และ Nested RPA-SYBR I	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วย เทคนิค RPA-SYBR I และ Nested RPA-SYBR I	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วย วิธี PCR และ Nested PCR	(PCR/ RPA-SYBR I) 62 (Nested PCR/ Nested RPA-SYBR I) 12	(RPA-SYBR I) 11 (Nested PCR/ Nested RPA-SYBR I) 5	90
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ ด้วย วิธี PCR และ Nested PCR	(Nested RPA) 1	(PCR/ RPA/ Nested PCR/ Nested RPA) 31	32
รวม	75	47	122

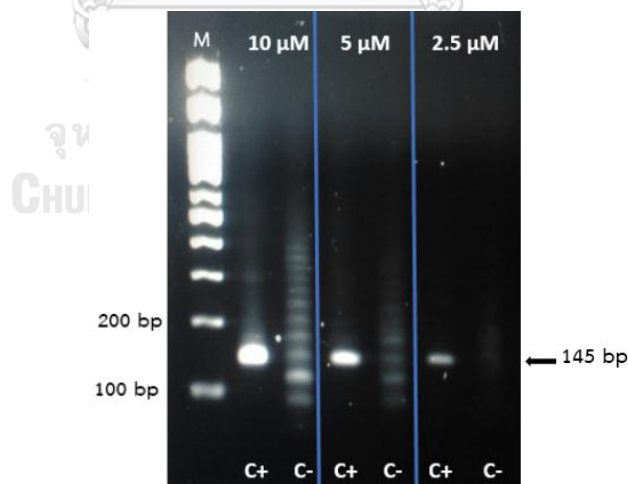
### 13. การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

ทำการพัฒนาเทคนิค RT-RPA เพื่อตรวจหา FeLV Viral RNA โดย สภาวะในการทำปฏิกิริยา ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l ประกอบด้วย โพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV เช่นเดียวกับ PCR และ RPA ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l ตัวอย่าง RNA ปริมาตร 1  $\mu$ l น้ำยา RNase Inhibitor ความเข้มข้น 0.4 U/ $\mu$ l ปริมาตร 2.5  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจาก

เชื้อ 9.7  $\mu\text{l}$  ส่วนผสมทั้งหมดเติมลงใน Freeze-dried RPA pellets จากนั้นเติม Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  บ่มปฏิกิริยาใน Heat block ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสม ได้แก่ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และ เวลา แล้วเตรียมผลผลิตให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% ซึ่งจะได้ขนาดของผลผลิตที่ 145 bp

### 13.1 การทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA

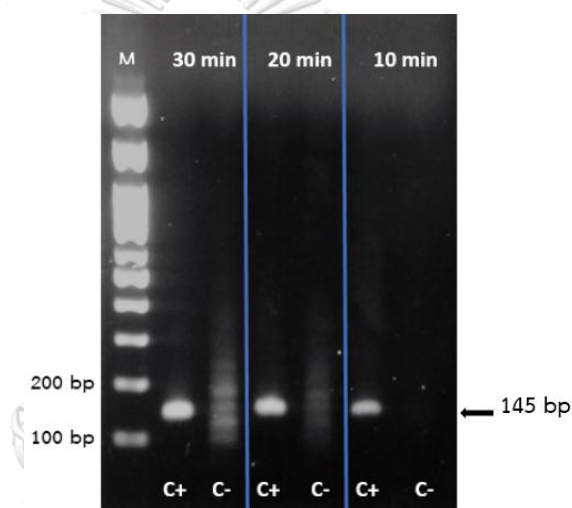
เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu\text{M}$  โดยทดสอบกับ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 40 ng/ $\mu\text{l}$  และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาที่ 5  $\mu\text{M}$  มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลุดควบคุมลบพบแถบ DNA ของไพรเมอร์ได้เมื่อน้อยกว่าที่ความเข้มข้นไพรเมอร์ 10  $\mu\text{M}$  ดังแสดงในภาพที่ 26 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา RT-RPA เท่ากับในปฏิกิริยา RPA ที่ใช้ตรวจหา FeLV Provirus



ภาพที่ 26 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5  $\mu\text{M}$  บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ

### 13.2 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{M}$  โดยทดสอบกับ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 40 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วทำผลผลิตที่ได้ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลผลิตไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่า เวลาในการบ่มปฏิกิริยา RT-RPA ที่เหมาะสมที่สุดคือ 10 นาที เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลุดควบคุมลบพบแถบ DNA ของไพรเมอร์ใดเมอร์ที่น้อยกว่าเวลาที่บ่มที่ 30 และ 20 นาที ดังแสดงในภาพที่ 27

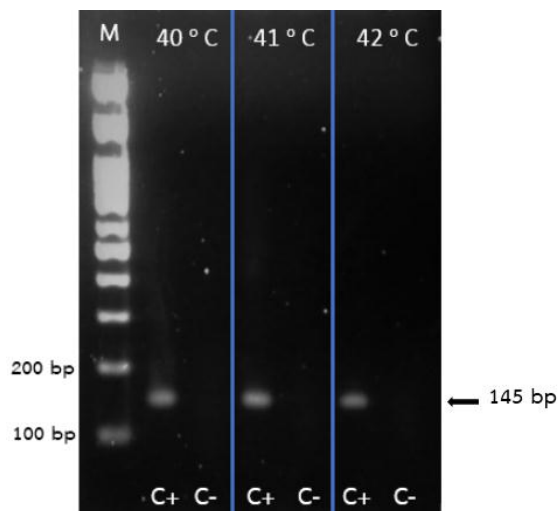


ภาพที่ 27 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ที่ใช้เวลาในการบ่มที่ 30, 20 และ 10 นาที บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

### 13.3 การทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-RPA

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 5  $\mu\text{M}$  โดยทดสอบกับ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 40 ng/ $\mu\text{l}$  บ่มใน Heat block ที่อุณหภูมิ 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำผลผลิต RPA ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลผลิต RPA ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

ไวรัสเข้มข้น 1.5% พบว่าทั้ง 3 อุณหภูมิ มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-RPA เนื่องจากยังคงให้ผลผลิต RPA ที่เข้มชัดเจน และหลุดควบคุมลบไม่พบแถบ DNA ของไพรมอร์โดเมอร์ดังภาพที่ 28



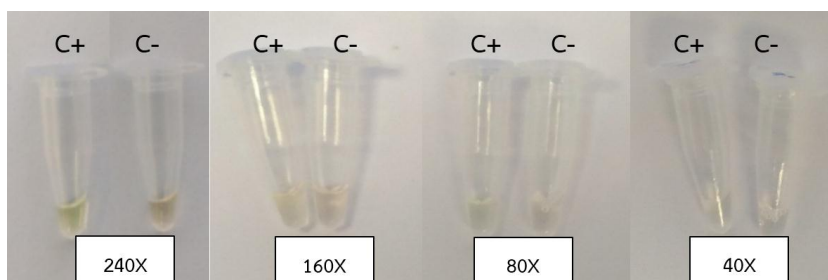
ภาพที่ 28 แสดงผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ที่อุณหภูมิในการบ่มที่ 40, 41 และ 42 องศาเซลเซียส บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 % ; M คือ 100 bp DNA ladder ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวอย่างควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

จากผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไพรมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu$ M ปริมาณ 2.4  $\mu$ l น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu$ l RNA ที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 1  $\mu$ l น้ำยา RNase Inhibitor ความเข้มข้น 0.4 U/ $\mu$ l ปริมาตร 2.5  $\mu$ l และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9.7  $\mu$ l และ Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu$ l ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu$ l ทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 13.4 การตรวจวิเคราะห์ผล RT-RPA ด้วยสี SYBR green I

เตรียมปฏิกิริยา RT-RPA ในปริมาตรรวม 50  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลผลิตมาเติมสี SYBR green I ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 240X 160X 80X และ 40X พบว่าความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ให้ความแตกต่างระหว่างผลบวกกับผลลบที่ชัดเจนที่สุดคือ ที่ความเข้มข้น 240X ดังแสดงในภาพที่ 29





ภาพที่ 29 แสดงผลการตรวจหา FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และตรวจสอบผลผลิต ด้วยสี SYBR I ที่ความเข้มข้นของสี SYBR green I ที่ 240X, 160X, 80X และ 25X ; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

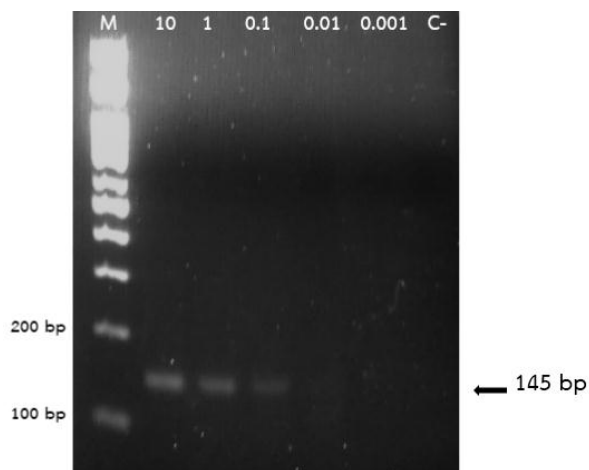
### 13.5 การทดสอบหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA

การทดสอบปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยเจือจาง FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ได้ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ทำปฏิกิริยา RT-RPA จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่าปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหา FeLV viral RNA ได้ คือ 0.1 ng/ $\mu$ l ในขณะที่ความเข้มข้น 0.01 พบแต่แถบ DNA จางๆ ของไพรมอร์ไต์เมอร์ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.001 ng/ $\mu$ l ไม่พบแถบ DNA ของไพรมอร์ไต์เมอร์ เช่นเดียวกันกับในหลอดควบคุมลบ ดังแสดงในภาพที่ 30

### 13. 6 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

นำ RNA ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดแมวที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ FeLV ทั้ง 122 ตัวอย่าง มาตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยใช้ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบแถบ DNA ที่มีขนาดผลผลิต 145 bp ตามที่คาดหวังไว้ จำนวน 53 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม พบว่ามีตัวอย่าง

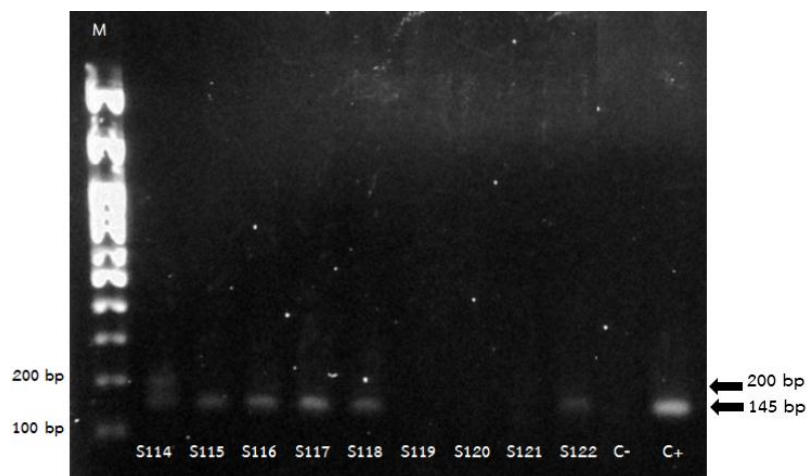
ที่ให้ผลผลิต 2 ขนาด คือ 145 bp และ 200 bp จำนวน 7 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 31 ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA ให้ผลบวก จำนวน 60 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 62 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 28



ภาพที่ 30 แสดงการทดสอบปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA บนวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5% ; M คือ 100 bp DNA ladder ; เลขที่ 1 ถึง 5 คือ RNA มาตรฐานที่สกัดจาก FeLV Viral RNA ในวัคซีนป้องกันโรคไวรัสแมวเร็งเม็ดเลือดขาว ที่ใช้ความเข้มข้น 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ng/ $\mu$ l ตามลำดับ และเลขที่ 6 คือ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ตารางที่ 28 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมวด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส จำนวน 122 ตัวอย่าง

ผลการตรวจ	จำนวน	รวม (122)
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RT-RPA ขนาด 145 bp	53	60
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยให้ผลผลิต RT-RPA ขนาด 145 และ 200 bp	7	
ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี RT-RPA	62	62



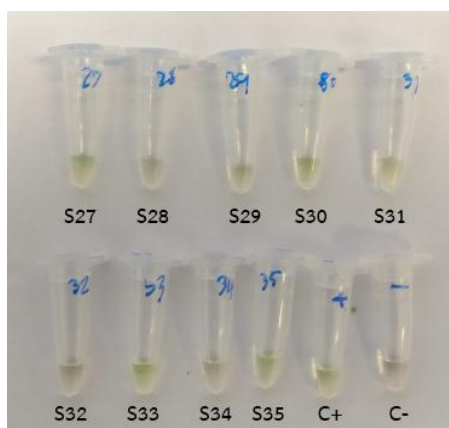
ภาพที่ 31 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา RT-RPA จากตัวอย่างเลือดแมว ตัวอย่างเลขที่ S114 – S122 บน ฐานอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5%; M คือ 100 bp DNA ladder; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัด จากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นหลอดควบคุมบวก และ C- คือ น้ำกลั่นที่ปราศจาก เชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ โดยจากตัวอย่างเลขที่ S114 ให้ผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp และ 145 bp ส่วนตัวอย่างเลขที่ S115 ถึง S118 และ S122 ให้ผลขนาด 145 bp

### 13.7 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และ วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

ใช้สี SYBR green I ความเข้มข้น 240X พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะมีสีเขียวอ่อน ขณะที่ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะมีสีส้มจางๆ ดังแสดงในภาพที่ 32 ผลการทดสอบผลผลิต RT-RPA จากตัวอย่างเลือดแมว จำนวน 122 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกจำนวน 56 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 66 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงผลสรุปการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และตรวจสอบ ผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

ผลการตรวจ	จำนวน
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	56
ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	66
รวม	122



ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA จากตัวอย่างเลือดแมว ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วย SYBR green I ของตัวอย่างหมายเลข S27 ถึง S35; C+ คือ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสแมวเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นตัวควบคุมบวก และ C- คือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

### 13.8 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลเทคนิค RT-RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและ SYBR green I ในการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% พบว่าการวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I ให้ผลลบลงจำนวน 12 ตัวอย่าง และผลบวกลง 8 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 30

### 13.9 การเปรียบเทียบผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I กับเทคนิค Rapid immunochromatographic assay

การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เทียบกับ เทคนิค Rapid immunochromatographic assay พบว่าเทคนิค RT-RPA ให้ผลลบลง 3 ตัวอย่าง แต่ไม่พบผลบวกลง ดังตารางที่ 31 โดยที่ทั้ง 3 ตัวอย่างที่ให้ผลลบลง ให้ผลการตรวจด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay และเทคนิค RT-PCR เป็นบวก โดยค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 95.24 (95% CI 86.71% - 99.01%)

ความจำเพาะร้อยละ 100.00 (95% CI 93.94% – 100.00%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 100.00 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 95.16 (95% CI 86.70% - 98.34%)

ตารางที่ 30 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยเปรียบเทียบการตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 1.5% กับการตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	48	12	60
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส	8	54	62
รวม	56	66	122

ตารางที่ 31 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assays เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-RPA gel	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-RPA gel	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	60	3	63
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	0	59	59
รวม	60	62	122

ตารางที่ 32 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-RPA SYBR	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-RPA SYBR	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	48	15	63
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay	8	51	59
รวม	56	66	122

เมื่อนำผลผลิต RT-RPA มาวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I พบว่ามีผลบลวง 15 ตัวอย่าง ผลบลวกลวง 8 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 32 โดยที่ผลบลวกลวงทั้ง 8 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจเป็นลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay และ RT-PCR และค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 76.56 (95% CI 64.31% - 86.25%) ความจำเพาะร้อยละ 86.21 (95% CI 74.62% - 93.85%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 85.96 (95% CI 76.04% - 92.20%) และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 76.92 (95% CI 67.90% - 84.00%) จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I มีความไวและความจำเพาะต่ำกว่าการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวันอะกาโรส

เมื่อคำนวณค่าทางสถิติความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวันอะกาโรส และเทคนิค Rapid immunochromatographic assay โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.951$ : CI 0.896 - 1.000 แสดงว่าทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก (มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81 - 1.00) และเมื่อทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I และเทคนิค Rapid

immuno-chromatographic assay ค่าสถิติ kappa (k) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.624$ : CI 0.487 – 0.762 แสดงว่าทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดี (0.61 – 0.80)

### 13.10 การตรวจหาเชื้อ FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และ SYBR green I เปรียบเทียบกับ เทคนิค RT-PCR

การตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เทียบกับ เทคนิค RT-PCR และวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่าเทคนิค RT-RPA ให้ผลลบลง 4 ตัวอย่าง แต่ไม่พบผลบวกลง ดังแสดงในตารางที่ 33 ส่วนการตรวจสอบผลผลิต RT-RPA ด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR I พบผลลบลง 16 ตัวอย่าง ผลบวกลง 8 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 34 โดยค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 93.75 (95% CI 84.76% - 98.27%) ความจำเพาะร้อยละ 100.00 (95% CI 93.84% – 100.00%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 100.00 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 93.55 (95% CI 84.88% - 97.40) และค่าทางสถิติที่คำนวณได้เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เป็นดังนี้ ความไวร้อยละ 75.00 (95% CI 62.60% - 84.98%) ความจำเพาะร้อยละ 86.21 (95% CI 74.62% – 93.85%) ค่าการทำนายผลบวกร้อยละ 85.71 (95% CI 75.64% - 92.06%) และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 75.76 (95% CI 66.88% - 82.87%) จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อวิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส มีความจำเพาะไม่แตกต่างกับเทคนิค RT-PCR

ทำการทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และเทคนิค RT-PCR เมื่อคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้ค่าสถิติ kappa (k) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.934$ : CI 0.871 – 0.997 แสดงว่าทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก (มีค่าเข้าใกล้ 1: 0.81 – 1.00) และเมื่อทดสอบความสอดคล้องกันของผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA วิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I และเทคนิค RT-PCR ค่าสถิติ kappa (k) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า  $k = 0.608$ : CI 0.469 – 0.747 แสดงว่าทั้ง 2 เทคนิค ให้ผลสอดคล้องกันในระดับปานกลาง (0.41 – 0.60)

ตารางที่ 33 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-RPA	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-RPA	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-PCR	60	4	64
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-PCR	0	58	58
รวม	60	62	122

ตารางที่ 34 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อตรวจสอบด้วยผลผลิตด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR

วิธีตรวจและผลการตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-RPA	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-RPA	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค RT-PCR	48	16	64
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยเทคนิค RT-PCR	8	50	58
รวม	56	66	122

14. สรุปและเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ Nested RPA และผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid Immunochromatographic Assays, RT-PCR และ RT-RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I

การตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus จากตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคต่างๆ พบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบ ดังสรุปในตารางที่ 35 โดยเชื่อว่าจะอยู่ในระยะ progressive infection จำนวน 64 ตัวอย่าง ในระยะ Regressive infection จำนวน 26 ตัวอย่าง และไม่ติดเชื้อ FeLV หรือเป็น Abortive infection จำนวน 32 ตัวอย่าง สรุปค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ของการตรวจหาเชื้อ



FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Nested PCR และของการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรสและด้วยตาเปล่า โดยใช้สี SYBR green I ดังสรุปในตารางที่ 36 จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ร่วมกับเทคนิค Nested RPA และวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส มีความไวสูงถึงร้อยละ 98.89 และความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 96.88 มีค่าความสอดคล้องกับเทคนิค PCR ในระดับดีมาก มีค่าสถิติ Kappa = 0.958 ขณะที่การตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA และวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ความไวสูงถึงร้อยละ 93.75 และความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 มีค่าความสอดคล้องกับเทคนิค PCR ในระดับดีมาก มีค่าสถิติ Kappa = 0.934



ตารางที่ 35 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ Nested RPA และผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay, RT-PCR และ RT-RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในหน่วยกะโหลกและด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I

วิธี	Rapid immunochromatographic assay	PCR	Nested PCR	PCR และ Nested PCR	RPA gel	Nested RPA gel	RPA และ Nested RPA gel	RPA SYBR I	Nested RPA SYBR I	RPA และ Nested RPA SYBR I	RT-PCR	RT-RPA gel	RT-RPA SYBR I
จำนวน													
ผลบวก	63	73	17	90	70	20	90	62	15	75	64	60	56
ผลลบ	59	49	32	32	52	32	32	60	37	47	58	62	66
รวม	122	122	49	122	122	52	122	122	52	122	122	122	122



ตารางที่ 36 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าสถิติ Kappa ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และ Nested RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Nested PCR และของการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA เปรียบเทียบกับเทคนิค RT-PCR และเทคนิค Rapid immunochromatographic assay โดยวิเคราะห์ผลผลิต RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสแสงไฟฟ้าใน ฐนอะภาโรสและด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I

	RPA gel VS PCR	RPA SYBR I VS PCR	RPA และ Nested RPA gel VS PCR และ Nested PCR	RPA และ Nested RPA SYBR I VS PCR และ Nested PCR	RT-RPA gel VS RT-PCR	RT-RPA SYBR I VS RT-PCR	RT-RPA gel VS Rapid immunochromatographic assay	RT-RPA SYBR I VS Rapid immunochromatographic assay
ความไว	95.89	84.93	98.89	82.22	93.75	75.00	95.24	76.56
ความจำเพาะ	100	100	96.88	96.88	100	86.21	100	86.21
ค่าการทำนายผลบวก	100	100	98.89	98.67	100	85.71	100	85.96
ค่าการทำนายผลลบ	94.23	81.67	96.88	65.96	93.55	75.76	95.16	76.92
ค่าสถิติ Kappa	0.949	0.819	0.958	0.687	0.934	0.608	0.951	0.624

ย SITY

## 15. การตรวจพบเชื้อ FeLV RNA และ Proviral DNA ในแมวป่วยแต่ละกลุ่มอาการ

จากผลการตรวจหาเชื้อ FeLV RNA และ Proviral DNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Nested PCR พบว่าแมวที่มีเนื้องอกหรือป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง พบการติดเชื้อ FeLV Provirus มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 87.5 ของแมวทั้งหมดในกลุ่ม ขณะที่แมวที่พบความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลือง ตรวจพบเชื้อ FeLV Provirus ร้อยละ 80 ของกลุ่ม ขณะที่แมวที่ไม่พบอาการป่วยทางคลินิกซึ่งเข้ามารับการตรวจสุขภาพ หรือรับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ามีการติดเชื้อ FeLV Provirus ถึงร้อยละ 64.29 ดังตารางที่ 37

ตารางที่ 37 สรุปผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ Nested RPA เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส โดยแยกตามกลุ่มอาการทางคลินิก หรือสาเหตุการป่วยของแมว

กลุ่มอาการทางคลินิก หรือสาเหตุการป่วยของแมว	จำนวนที่พบเชื้อ FeLV (ตัว)/จำนวนแมวที่ป่วย (ตัว)	ร้อยละ
1. กลุ่มที่มีเนื้องอกหรือป่วยด้วยโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว	49/56	87.50
2. กลุ่มที่พบความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลือง	8/10	80.00
3. กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อไวรัส FIV กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่นๆ ได้แก่ FHV, FCV, FIP และ <i>Mycoplasma haemofelis</i>	10/17	58.82
4. กลุ่มที่ป่วยโรคเรื้อรังและยังไม่สามารถหาสาเหตุของโรคได้ เช่น น้ำหนักลด ซึม เบื่ออาหาร กลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ หรือไม่ติดเชื้ออื่นๆ แยกตามระบบอวัยวะ ได้แก่ โรคไต โรคหัวใจ โรคผิวหนัง โรคระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และโรคระบบสืบพันธุ์	14/25	56.00
5. กลุ่มที่มารับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาว และตรวจสุขภาพ	9/14	64.29
รวม	90/122	73.77

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

โรคติดเชื้อไวรัสเมริงเม็ดเลือดขาวในแมว (FeLV) เป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญในแมว นอกจากก่อให้เกิดโรคเมริงเม็ดเลือดขาว ยังเป็นสาเหตุของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในแมวหรือในสัตว์ตระกูลแมวอีกด้วย (1, 2) โดยสามารถแบ่งระยะการติดเชื้อจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้ คือ ตรวจพบได้ทั้ง FeLV Viral RNA และ FeLV Provirus เพียงชั่วคราว (Transient viremia) มักเกิดในแมวที่ได้รับเชื้อในปริมาณต่ำๆ ซึ่งในแมวสุขภาพดีระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถกำจัดเชื้อได้จนหมดไป เรียกการติดเชื้อแบบนี้ว่า Abortive infection หากตรวจพบเฉพาะ FeLV Provirus ไม่พบ FeLV viral RNA แสดงว่าแมวมีการติดเชื้อแบบ Regressive infection ซึ่ง FeLV Provirus DNA จะแทรกตัวในดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านทำให้มีโอกาสถ่ายทอดเชื้อไปยังรุ่นลูกหลานผ่าน germ cell ได้ แต่ถ้าหากยังคงตรวจพบไวรัสในกระแสเลือดหลังจากได้รับเชื่อนานกว่า 16 สัปดาห์ (Persistent viremia) จะเป็นการติดเชื้อในระยะ Progressive infection ซึ่งเป็นระยะที่มีโอกาสแพร่เชื้อสูง (15) การตรวจวินิจฉัยโรค FeLV จึงมีความสำคัญในทางคลินิก และการป้องกันควบคุมโรค ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธี Rapid immunochromatographic assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหา FeLV แอนติเจน และเทคนิค PCR เพื่อตรวจหา FeLV Provirus และ FeLV Viral RNA แต่เนื่องจากเทคนิค PCR ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางที่มีราคาแพง และบุคลากรที่มีทักษะทางอณูชีววิทยา การตรวจหา FeLV Provirus และ FeLV RNA จึงไม่เป็นที่นิยมในการตรวจในคลินิกสัตว์แพทย์ทั่วไป ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเดียว เพื่อตรวจหา FeLV Provirus และพัฒนาเทคนิค RT-RPA ในการตรวจหา FeLV Viral RNA ในกระแสเลือดของแมว

จากการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างเลือดแมวทั้งสิ้น 122 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ U3LTR ของ exogenous FeLV พบว่ามีตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 61 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตขนาด 145 bp ตามที่คาดหวังไว้ อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตขนาดประมาณ 200 bp และมีตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ให้ผลผลิตทั้ง 2 ขนาด คือ 145 bp และประมาณ 200 bp ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ

โอไทด์พบว่าผลผลิตขนาด 200 bp มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน U3LTR ของ exogenous FeLV Provirus (Accession number: AY374189) ทุกตัวอย่าง และมีความเหมือนกับ Feline leukemia virus strain Rickard subgroup A, complete genome (Accession number: AF052723) Feline leukemia virus DNA sequence (Accession number: L25632) และ Feline leukemia virus v-myc gene ,complete cds (Accession number: M25762) ถึงร้อยละ 95.24 และลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ลำดับที่ 84 – 146 มีการเรียงตัวที่ซ้ำกันเป็นชุดๆ ละ 21 ตัว จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าบริเวณ LTR ซึ่งประกอบไปด้วย Promoter gene และ Enhancer gene ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *gag*, *pol*, *env* บริเวณ Enhancer gene มีโอกาสเกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น อาจมีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ซ้ำๆ ได้ตั้งแต่ 39 – 77 คู่เบส หรืออาจมีการเพิ่มชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน ชุดละ 21 คู่เบส โดยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมักมีรูปแบบที่สัมพันธ์กับชนิดของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดหลายตำแหน่ง (Multicentric lymphoma) หรือ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Non T-Cell (25) ส่วน *v-myc* gene เป็น proto-oncogene ที่สามารถแทรกอยู่ได้ในทุกๆ บริเวณของสายลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ FeLV ซึ่งมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ (80) จากผลการตรวจหาเชื้อ FeLV provirus ด้วยเทคนิค PCR พบผลบวกทั้งสิ้น 73 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 59.8 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และ ผลลบทั้งสิ้น 49 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.2 จากตัวอย่างทั้งหมด

ในงานวิจัยนี้ยังได้ตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested PCR โดยทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปฐมภูมิของตัวอย่างที่ให้ผลลบจากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเทคนิค Nested PCR ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นจากที่ตรวจด้วยเทคนิค PCR จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34.7 (17/49) โดยมีผลผลิตขนาด 101 bp เทคนิค Nested PCR จึงมีความไวและความจำเพาะในการตรวจหา FeLV Proviral DNA สูงกว่าเทคนิค PCR เช่นเดียวกับ Tozon และคณะ พบว่าเทคนิค Nested PCR ตรวจพบ FeLV Proviral DNA เพิ่มสูงขึ้นกว่าเทคนิค PCR ร้อยละ 20 (4/20) (76) ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่พบ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR จึงมีจำนวนทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73.77 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และ จำนวนตัวอย่างที่ไม่พบ FeLV Provirus มีจำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.2 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

การตรวจ FeLV p27 antigen จากตัวอย่างเลือดแมวจำนวน 122 ตัว ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Rapid Immunochromatographic assay เปรียบเทียบกับการตรวจหาเชื้อ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR พบผลบวกที่ไม่สอดคล้องกันเพียง 1 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RT-PCR ให้ผลบวกทั้งสิ้น 64 ตัวอย่าง ขณะที่ Rapid immunochromatographic assay ให้ผลบวกทั้งสิ้น 63 ตัวอย่าง และให้ผลลบตรงกันทั้งหมด 59 ตัวอย่าง Westman และคณะ พบว่าเทคนิค Rapid immunochromatographic assay เกิดผลลบลวงร้อยละ 8.89 จากตัวอย่างที่ติดเชื้อในระยะ Progressive infection (81) จากผลการตรวจหาเชื้อ FeLV ด้วยวิธี Rapid immunochromatographic assay ที่ให้ผลเป็นลบจำนวน 59 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR และ Nested PCR พบว่าเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้มากขึ้นคิดเป็นร้อยละ 16.9 (10/59) ขณะที่เทคนิค Nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้มากขึ้นคิดเป็นร้อยละ 45.8 (27/59) การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา อาทิเช่น PCR, Nested PCR, Real-time PCR มีข้อดีกว่าการตรวจทางซีรัมวิทยา เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะ สูงกว่าและสามารถตรวจหา Provirus ได้ (61-63) ส่วนการตรวจทางซีรัมวิทยาสามารถบอกได้เพียงว่าแมวนั้นเคยได้รับเชื้อ FeLV มาก่อนหรือไม่ Boenzil และคณะ พบว่าตัวอย่างน้ำเหลืองที่ให้ผลลบของแอนติบอดีต่อ p27 และ p15E antigen มีแนวโน้มที่จะไม่เคยได้รับเชื้อ FeLV มาก่อน และระดับแอนติบอดีต่อ p15E antigen ของการติดเชื้อตามธรรมชาติมีระดับที่สูงกว่าการได้รับเชื้อจากการฉีดวัคซีน ขณะที่ระดับแอนติบอดีต่อ FeLV antigen ชนิดอื่นๆ พบว่ามีความไม่จำเพาะ (82) ส่วนการเพาะแยกเชื้อไวรัสมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เช่น เซลล์เพาะเลี้ยง Feline embryonic fibroblast cell line (FEA) (68) และตรวจหาเชื้อ FeLV ได้เฉพาะระยะที่มีการแพร่กระจายของไวรัสอยู่ในกระแสเลือด หรือ Progressive infection เท่านั้น

จากผลการตรวจ FeLV p27 antigen, FeLV RNA และ Provirus ข้างต้น พบแมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection คือพบทั้ง FeLV RNA และ exogenous FeLV Provirus ถึงร้อยละ 52.45 (64/122) แมวที่น่าจะติดเชื้อ FeLV ในระยะ Regressive infection คือพบเพียง exogenous FeLV Provirus ร้อยละ 21.3 (26/122) และแมวที่ไม่ติดเชื้อ FeLV หรือ เป็น Abortive infection ร้อยละ 26.2 (32/122) เมื่อนำผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาวิเคราะห์ในแต่ละกลุ่มอาการของโรคพบว่าแมวที่ป่วยด้วยกลุ่มอาการที่มีเนื้องอกหรือป่วยด้วยโรคมะเร็ง เช่น

มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบแมวติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 87.5 โดยเป็นการติดเชื้อแบบ Progressive infection ถึงร้อยละ 92.86 แมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง 3 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อแบบ Regressive infection และแมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองร่วมกับมะเร็งเม็ดเลือดขาว 3 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อแบบ Progressive infection ส่วนแมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ จำนวน 4 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อแบบ Regressive infection งานวิจัยก่อนหน้านี้ในประเทศเยอรมันนี้ได้ทำการตรวจ FeLV antigen ย้อนหลังสองช่วงเวลาในแมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวคือ ระหว่างปี ค.ศ. 1980 – 1994 และ ค.ศ. 1995 – 2009 พบแมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองและติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection ร้อยละ 41 ในระหว่างปี ค.ศ. 1980 – 1994 และร้อยละ 13 ในระหว่างปี ค.ศ. 1995 – 2009 (83) เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าในแมวที่ติดเชื้อ FeLV มีความเสี่ยงที่จะป่วยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองเพิ่มขึ้นถึง 60 เท่า (1) การตรวจติดตามแมวที่ตรวจพบการติดเชื้อ FeLV Viral RNA ร่วมกับตรวจพบกลุ่มอาการของความผิดปกติของไขกระดูก (Myelodysplastic syndrome) จนแมวเสียชีวิต พบว่าแมвр้อยละ 33.3 มีการพัฒนาของโรคเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว และทั้งหมดเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML โดยร้อยละ 16.7 เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง และร้อยละ 25 เป็นโรคโลหิตจาง (84) กลุ่มที่มีความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลือง พบแมวติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 80 โดยร้อยละ 75 มีการติดเชื้อแบบ Progressive infection ขณะที่อีกร้อยละ 25 เป็นการติดเชื้อแบบ Regressive infection งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแมวที่ป่วยหรือได้รับเชื้อ FeLV มีโอกาสที่จะป่วยเป็นโรคโลหิตจาง หรืออาจมีภาวะเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ (Leukopenia) หรืออาจพบภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์ในกระแสเลือดมีจำนวนต่ำกว่าปกติ (Lymphopenia) ได้ (85) Collado และคณะ ได้ตรวจหาเชื้อ FeLV ในแมวที่มีภาวะโลหิตจาง พบแมวที่ติดเชื้อ FeLV ร้อยละ 32.26 (86) Hartmann พบว่าแมวที่ติดเชื้อ FeLV และมีภาวะกดไขกระดูก หรือ Myelosuppression สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดได้มากกว่าร้อยละ 90 (15)

สำหรับแมวกกลุ่มที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV และโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่สำคัญในแมว พบการติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 58.82 (10/17) โดยพบการติดเชื้อร่วมกันกับเชื้อ FIV ถึง 6 ตัวอย่าง ในจำนวน 9 ตัวอย่างของแมวที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV และเป็นการติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection และ Regressive infection อย่างละ 3 ตัวอย่าง ขณะที่แมวที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่นๆ 8 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ FeLV ร่วมด้วย 4 ตัวอย่าง โดยเป็นการติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive



infection และ Regressive infection อย่างละ 2 ตัวอย่าง งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าแมวที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV จำนวน 69 ตัว ในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล มีการติดเชื้อร่วมกับ FeLV Viral RNA ถึงร้อยละ 39.13 (6) Cong และคณะ พบการป่วยของแมวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของสาธารณรัฐประชาชนจีนจากเชื้อ FIV ร่วมกับเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection จำนวน 34 ตัว จากแมวที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อ FIV ทั้งหมด 90 ตัว คิดเป็นร้อยละ 37.78 (87) Spada และคณะ ยังพบการติดเชื้อ FeLV ร่วมกับเชื้อก่อโรคอื่นๆ ในแมว ได้แก่ *Leishmania infantum*, *Feline coronavirus*, *Toxoplasma gonii* และ *Bartonella henselae* ร้อยละ 23.08 (88) มีการพบการติดเชื้อ FeLV ร่วมกับปรสิตในเลือด เช่น *Dirofilaria immitis* และ *Toxoplasma gondii* (87) สำหรับกลุ่มที่ป่วยเรื้อรังและยังไม่สามารถหาสาเหตุของโรค พบการติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 56 (14/25) โดยพบการติดเชื้อ FeLV ในระยะ Progressive infection 6 ตัวอย่าง และ Regressive infection 8 ตัวอย่าง จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแมวที่ติดเชื้อ FeLV ก่อให้เกิดภาวะกดภูมิคุ้มกันเป็นเหตุให้แมวติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่าย (15, 58) Suntz และคณะ ได้พบการติดเชื้อ FeLV จากตัวอย่างไขกระดูกในแมวที่มีประวัติป่วยด้วยโรคเรื้อรัง แยกตามระบบอวัยวะ ได้แก่ โรคไต โรคหัวใจ โรคระบบทางเดินอาหาร และโรคระบบทางเดินหายใจ พบการติดเชื้อในระยะ Progressive infection ร้อยละ 18.45 และ ระยะ Regressive infection ร้อยละ 50.48 (62) Nesina และคณะ พบการติดเชื้อในระยะ Regressive infection ในแมวที่ป่วยด้วยโรคไต ร้อยละ 12.5 (89)

สำหรับกลุ่มที่มารับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสระยะเรื้อรังเม็ดเลือดขาวและตรวจสุขภาพในแมว พบแมวติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 64.29 (9/14) ทั้งที่แมวในกลุ่มนี้ไม่พบอาการทางคลินิกใดๆ ที่บ่งชี้ถึงอาการป่วยหรือการติดเชื้อ โดยมีจำนวน 4 ตัวอย่างมีการติดเชื้อแบบ Progressive infection และมี 5 ตัวอย่างมีการติดเชื้อแบบ Regressive infection งานวิจัยก่อนหน้านี้มีรายงานการพบการติดเชื้อ FeLV ในแมวที่มีสุขภาพดีร้อยละ 47.4 (90) Weatman และคณะ พบการติดเชื้อ FeLV ในแมวสุขภาพดีแบบ Regressive infection ร้อยละ 2 และ Progressive infection ร้อยละ 0.5 และ Abortive infection ถึงร้อยละ 11 (91) ดังนั้นแมวที่ติดเชื้อ FeLV จำนวนหนึ่งอาจไม่แสดงอาการป่วย ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแมวที่ได้รับเชื่อว่ามีประสิทธิภาพหรือไม่ โดยพบว่าหลังไวรัสเข้าสู่ไขกระดูกมีแมวบางส่วนที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสที่แพร่เข้าสู่กระแสเลือดได้คงเหลือแต่เพียง Provirus ในเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก เชื้อไวรัสอาจกลับมาเพิ่มจำนวนและแพร่เชื้อได้ หากระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ FeLV ลดลง นอกจากนี้พบว่า FeLV provirus อาจเข้าไปขัดขวาง

หรือหยุดการทำงานของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน หรือเปลี่ยนการแสดงออกของยีนข้างเคียงทำให้การทำงานของเซลล์เปลี่ยนไป (15) ดังนั้น อาการทางคลินิกของแมวที่ติดเชื้อ FeLV Provirus ทั้งระยะ Progressive และ Regressive infection จึงพบได้ทั้งอาการทางคลินิกและไม่พบความผิดปกติใดๆ แมวสุขภาพดีกลุ่มนี้จึงมีโอกาสแพร่เชื้อไปยังแมวอื่นๆ ได้สูง จึงควรแยกเลี้ยงแมวที่มีเชื้อจากแมวอื่น ไม่ให้น้ำและอาหารในภาชนะเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบแมวที่ติดเชื้อในระยะ Regressive infection ถึงร้อยละ 44.08 ของแมวที่ให้ผลการตรวจเป็นลบด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay หากแมวที่ติดเชื้อในระยะนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นแมวที่ไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิก มีโอกาสที่จะถูกนำไปบริจาคเลือด นั้นหมายถึงเป็นการแพร่เชื้อโดยมิได้ตั้งใจ ทำให้แมวที่เป็นตัวรับมีโอกาสที่จะติดเชื้อและป่วย ดังเช่นในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทดลองให้เลือดจากแมวที่ให้ผลบวกกับ FeLV Provirus แต่ให้ผลลบกับ FeLV Viral RNA ในแมวทดลอง พบว่าเมื่อตรวจติดตาม 2 ใน 5 ตัว พบการติดเชื้อแบบ Progressive infection โดย 1 ตัว ป่วยด้วยโรคโลหิตจางชนิด Non-regenerative anemia ในสัปดาห์ที่ 31 หลังได้รับเลือด และอีก 1 ตัว ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Multicentric T-cell lymphoma ในสัปดาห์ที่ 84 หลังได้รับเลือด ส่วนอีก 3 ตัว ติดเชื้อแบบ Regressive infection โดยที่ 1 ใน 3 ตัวนี้ ตรวจพบว่าป่วยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Multicentric T-cell lymphoma ในสัปดาห์ที่ 133 หลังได้รับเลือด (89)

การพัฒนาเทคนิค RPA และ Nested RPA ในการตรวจหา FeLV Provirus โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RPA ต่างๆ พบว่าได้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu$ M พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ หรือหากน้อยเกินไปก็จะได้ผลผลิตที่น้อย อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หากอุณหภูมิสูงเกินไปหรือเวลาน้อยเกินไปจะได้ผลผลิตน้อย และ หากอุณหภูมิต่ำเกินไปหรือเวลามากเกินไปพบว่าเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ในหลอดควบคุมลบ และเมื่อทดสอบปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA โดยใช้ DNA โคลน U3LTR มาทดสอบ พบว่าความเข้มข้นของ DNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ได้ คือ 1 ng/ $\mu$ l การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ Feline calicivirus (FCV), Feline immunodeficiency virus (FIV), Feline coronavirus (FCoV), Feline herpesvirus (FHV) และ Feline morbillivirus (FeMV) รวมถึงเชื้อ *Mycoplasma haemofelis* ผลการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และตรวจสอบ

ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่าการตรวจด้วยเทคนิค RPA ให้ผลลบลง 3 ตัวอย่าง สาเหตุอาจเกิดจากปริมาณ DNA ของ FeLV Provirus ในตัวอย่างน้อยกว่าขีดจำกัดของการตรวจด้วยเทคนิค RPA ที่ 1 ng/ $\mu$ l โดยเทคนิค RPA ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหา FeLV Provirus มีความไวร้อยละ 95.89 และความจำเพาะร้อยละ 100 คำนวณค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa ได้ค่าเท่ากับ 0.949 คือให้ผลที่สอดคล้องกับ PCR ดีมาก

อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อ FeLV provirus ด้วยเทคนิค RPA การศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Nested RPA ขึ้นมาควบคู่กัน โดยการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Nested RPA ต่างๆ พบว่าได้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมคือ 7.5  $\mu$ M ปริมาณผลผลิต RPA ปฐมภูมิเหมาะสม คือ เจือจาง 100 เท่า และใช้ปริมาตร 2  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หากใช้ปริมาณไพรเมอร์มากเกินไป เวลาในการบ่มนานเกินไป และอุณหภูมิต่ำเกินไป พบว่าเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ในหลอดควบคุมลบ และหากใช้ปริมาณไพรเมอร์น้อยเกินไป เวลาในการบ่มสั้น และอุณหภูมิสูงเกินไป จะได้ผลผลิต RPA ในปริมาณน้อย ผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA จากตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบในการตรวจด้วยเทคนิค RPA จำนวน 53 ตัวอย่าง แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่าให้ผลบวกเพิ่มขึ้น ร้อยละ 37.7 (20/53) เมื่อเปรียบเทียบผลของเทคนิค RPA ร่วมกับ Nested RPA กับผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ Nested PCR พบว่ามีค่าความไวสูงถึงร้อยละ 98.89 ความจำเพาะลดลงเล็กน้อยจากร้อยละ 100 เหลือ 96.88 ค่าการทำนายผลบวก ร้อยละ 98.89 และค่าการทำนายผลลบร้อยละ 96.88 โดยพบว่ามีผลบวกลงและผลลบลงเกิดขึ้นอย่างละ 1 ตัวอย่าง คำนวณค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa ได้ค่าเท่ากับ 0.958 คือ ให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ในการตรวจ FeLV Provirus พบว่าการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค insulated isothermal PCR (iiPCR) ของ Wilkes และคณะ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค qPCR มีขีดจำกัดของการตรวจที่ 6 copies ความไวที่ร้อยละ 98.82 ค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa เท่ากับ 0.97 (92) และถึงแม้จะมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิคข้างต้น เทคนิค PCR (80), Nested PCR และ real-time PCR (93) ก็ยังคงเป็นที่นิยมอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง

การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้ SYBR green I เปรียบเทียบกับเทคนิค RPA แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยก

ขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่าค่าความไวลดลงจากร้อยละ 95.89 เป็น ร้อยละ 84.93 ขณะที่ความจำเพาะเป็นร้อยละ 100 เท่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบผลของ Nested RPA ที่อ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I กับ Nested PCR พบว่ามีค่าความไว ร้อยละ 82.22 และ ค่าความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 96.88 การตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA หรือ Nested RPA และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I จึงน่าจะเหมาะในการใช้ตรวจยืนยันการติดเชื้อ FeLV ที่รวดเร็ว แต่อาจจะไม่เหมาะสมในการใช้คัดกรองการติดเชื้อ FeLV เนื่องจากมีความไวต่ำกว่า การตรวจสอบผลด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส สาเหตุน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของสี SYBR green I ที่สามารถแทรกใน DNA สายคู่ได้ รวมถึงไพโรเมอร์ไโดเมอร์ด้วย ปริมาณ DNA สายคู่เพียง 20 pg ก็สามารถตรวจสอบด้วยสี SYBR green I ได้ นอกจากนี้การปนเปื้อนของ DNA สายเดี่ยวหรือ RNA เพียง 100 ถึง 300 pg (77) ทำให้เกิดสีเขียวจางๆ ได้ จึงอาจทำให้มองเห็นเป็นผลบวกหลง ขณะที่ในบางตัวอย่างที่อาจมีปริมาณของผลผลิตน้อยมาก SYBR green I จับกับ DNA สายคู่ที่เป็นผลผลิตได้น้อย ทำให้มองเห็นเป็นสีส้มเกิดเป็นผลลบหลง หรือการปนเปื้อนของ DNA ที่ไม่ใช่ DNA เป้าหมายในหลอดควบคุมลบ เกิดการจับกันของ DNA นั้นกับสี SYBR green I เกิดเป็นสีเขียวจางๆ ทำให้เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดตัวอย่างที่ให้ผลผลิตในปริมาณน้อย สีที่เกิดขึ้นอาจต่างกันไม่มาก ทำให้มองเห็นเป็นผลลบหลงขึ้นได้

การพัฒนาเทคนิค RT-RPA เพื่อตรวจหา FeLV Viral RNA โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-RPA ต่างๆ พบว่าได้ความเข้มข้นของไพโรเมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu\text{M}$  บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หากความเข้มข้นของไพโรเมอร์สูงหรือเวลาในการทำปฏิกิริยานานเกินไปจะเกิดไพโรเมอร์ไโดเมอร์ และเมื่อทดสอบปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดของการตรวจ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA โดยใช้ FeLV Viral RNA ที่สกัดจากวัคซีนป้องกันโรคไวรัสเมะเร็งเม็ดเลือดขาวมาทดสอบ พบว่าความเข้มข้นของ RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหา FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA ได้ คือ 0.1 ng/ $\mu\text{l}$  ผลการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส เมื่อเปรียบเทียบกับ RT-PCR มีความไวร้อยละ 93.75 และ ความจำเพาะร้อยละ 100 คำนวณค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa ได้ค่าเท่ากับ 0.934 คือมีความสอดคล้องในระดับดีมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Rapid immunochromatographic assay พบว่าความไวคิดเป็นร้อยละ 95.24

ความจำเพาะร้อยละ 100 และค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa เท่ากับ 0.951 ซึ่งสอดคล้องกันในระดับดีมาก ดังนั้น เทคนิค RT-RPA จึงสามารถนำมาใช้ตรวจหา FeLV RNA ซึ่งบ่งถึงการติดเชื้อในระยะ Progressive infection ได้ เนื่องจากมีข้อดีกว่า RT-PCR ที่ไม่ต้องใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมซึ่งมีราคาแพง และได้ผลสอดคล้องและใกล้เคียงกับเทคนิค Rapid immunochromatographic assay ในงานวิจัยของ Wilkes และคณะ ได้พัฒนาเทคนิค RT-iiPCR และเปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA โดยตรวจหา p27 antigen เช่นเดียวกับเทคนิค Rapid immunochromatographic assays พบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 98.61 และทั้ง 2 เทคนิคให้ผลสอดคล้องกันในระดับดีมาก โดยค่าสถิติ Kappa มีค่าเท่ากับ 0.85 (92) ส่วนความไวที่ลดลงอาจเกิดจากปริมาณตัวอย่าง RNA ที่ใช้ทดสอบน่าจะมีความเข้มข้นต่ำกว่าขีดจำกัดในการตรวจที่ 0.1 ng/ $\mu$ l หรือจำนวน copies ของ RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหา FeLV Viral RNA อาจมีจำนวนต่ำกว่า 10 copies เนื่องจากจำนวน copies ของ RNA ที่ 10 – 20 copies สามารถตรวจได้ภายในเวลา 2 – 20 นาที (17) ซึ่งเทคนิค RT-RPA ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที อาจจะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างทดสอบที่มีปริมาณ RNA ที่น้อยมากๆ จากงานวิจัยของ Torres และคณะ ที่การตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR พบว่ามีขีดจำกัดในการตรวจเพียง 10 copies มีความไวและความจำเพาะถึงร้อยละ 100 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหา FeLV p27 capsid antigen ด้วยเทคนิค capture ELISA ค่าความสอดคล้องทางสถิติ kappa มีค่าเท่ากับ 0.68 ทั้งสองเทคนิคให้ผลสอดคล้องกันระดับดี (66)

เมื่อนำผลผลิต RT-RPA มาวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส พบว่าความไวลดลงจากร้อยละ 93.75 เป็น ร้อยละ 75 และ ความจำเพาะลดลงจากร้อยละ 100 เป็น 86.21 มีค่าสถิติ Kappa = 0.608 คือให้ผลสอดคล้องกันในระดับปานกลาง และเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้เทคนิค Rapid immunochromatographic assay พบว่าความไวคิดเป็นร้อยละ 76.56 ความจำเพาะร้อยละ 86.21 และค่าความสอดคล้องด้วยสถิติ Kappa เท่ากับ 0.624 มีความสอดคล้องกันในระดับดี ดังนั้นการวิเคราะห์ผล RT-RPA ด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I ต้องมีการพัฒนาปรับปรุงให้มีความไว มากยิ่งขึ้นต่อไป โดยการตรวจผลผลิต RPA ด้วยวิธีการอื่นๆ อาทิเช่น เทคนิค Lateral flow (94) หรือหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจด้วยสี SYBR green I เช่น โดยการเพิ่มปริมาณ DNA แม่แบบ หาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เวลา อุณหภูมิ ความเข้มข้นของ

ไพรมอร์ ความเข้มข้นของสี SYBR green I หรืออาจจะพัฒนาเทคนิค RPA โดยใช้ชนิดอื่นในการวิเคราะห์ผลผลิต เช่น EvaGreen ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการเกิดผลบวกวงได้ (95) เป็นต้น



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาเทคนิค RPA และ Nested RPA เพื่อใช้ตรวจ FeLV Provirus และ RT-RPA เพื่อตรวจ FeLV RNA ได้สำเร็จ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค RPA สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu\text{M}$  ปริมาณ 2.4  $\mu\text{l}$  น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu\text{l}$  DNA ที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 1  $\mu\text{l}$  น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 12.2  $\mu\text{l}$  และ Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อ FeLV provirus ด้วยเทคนิค Nested RPA ปริมาตรรวม 50  $\mu\text{l}$  ได้ดังนี้ ความเข้มข้นของไพรเมอร์คือ 7.5  $\mu\text{M}$  บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และใช้ผลผลิต RPA ปฐมภูมิที่เจือจาง 100 เท่า ปริมาตร 2  $\mu\text{l}$  ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหา FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค RT-RPA สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ 5  $\mu\text{M}$  ปริมาณ 2.4  $\mu\text{l}$  น้ำยา Rehydration buffer 29.5  $\mu\text{l}$  RNA ที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 1  $\mu\text{l}$  น้ำยา RNase Inhibitor ความเข้มข้น 0.4 U/ $\mu\text{l}$  ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9.7  $\mu\text{l}$  และ Magnesium acetate ความเข้มข้น 280 mM ปริมาตร 2.5  $\mu\text{l}$  ปริมาตรรวมทั้งหมด 50  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต RPA ด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในรุ่นอะกาโรสพบว่า มีความไวสูง และให้ค่าความสอดคล้องกับเทคนิค PCR, Nested PCR และ RT PCR ในเกณฑ์ดีมาก ขณะที่การวิเคราะห์ผลด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I ให้ความจำเพาะสูง จึงสามารถใช้ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อ FeLV แบบรวดเร็วในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่อง Thermal cycle เทคนิค Nested PCR และ Nested RPA สามารถตรวจหา FeLV Provirus จากแมวที่ติดเชื้อในระยะ Regression ได้จำนวนมากถึงร้อยละ 45.8 ซึ่งวิธี Rapid immunochromatographic assay ไม่สามารถตรวจได้ การตรวจหา FeLV Provirus จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของโรค แมวกลุ่มที่มารับวัคซีนป้องกันโรคไวรัสสะเร็งเม็ดเลือดขาวและตรวจสุขภาพ พบแมวติดเชื้อ FeLV ถึงร้อยละ 64.29 แสดงให้เห็นว่าแมวที่มีสุขภาพดีอาจมีการติดเชื้อ FeLV แต่ไม่

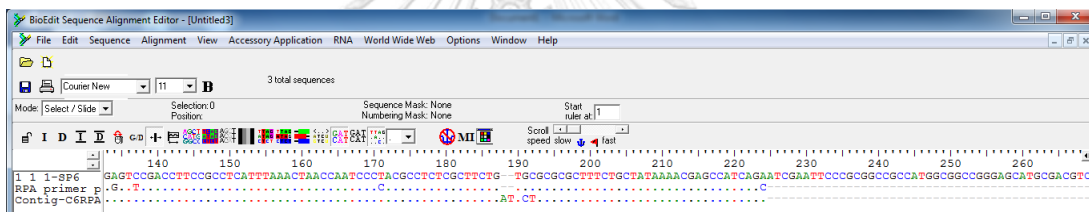
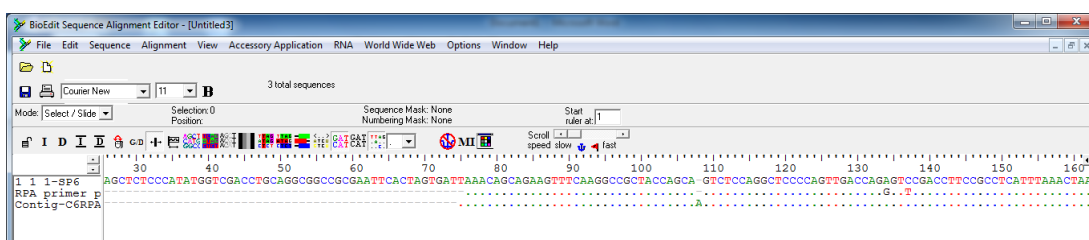
แสดงอาการ ซึ่งทำให้แมวกู๋มีโอกาสรักษาได้สูงเนื่องจากไม่ได้ถูกเฝ้าระวัง ขณะที่กลุ่มแมวที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว และ แมวที่มีความผิดปกติของระบบเลือดและน้ำเหลือง มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อสูงถึงร้อยละ 87.5 และ 80 ตามลำดับ การพัฒนาเทคนิค RPA, Nested RPA และ RT-RPA จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจหา FeLV Provirus และ FeLV Viral RNA เพื่อใช้แยกระยะของการติดเชื้อ การพยากรณ์โรค การวางแผนการรักษา และการป้องกันควบคุมโรค ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป สะดวก ทำได้ง่าย มีความไว และความจำเพาะสูง อีกทั้งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการวิเคราะห์ผลผลิตด้วยเทคนิค Lateral flow และ เป็นพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูปได้ต่อไป





## ภาคผนวก

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โคลน U3LTR ของเชื้อ FeLV เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คาดหวังจากไพรเมอร์ซึ่งใช้ในปฏิกิริยา PCR, RPA, RT-PCR และ RT-RPA ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน U3LTR แม่แบบที่ใช้โคลน ด้วยโปรแกรม BioEdit Alignment



2. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โคลน U3LTR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน U3LTR บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายกันที่ระดับร้อยละ 94 ขึ้นไปจนถึงระดับร้อยละ 100 ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))



Range 2: 8150 to 8294 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
230 bits(124)	2e-56	138/145(95%)	0/145(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACAGCATAAGTTTCAAGGCCGCTACCACAGTCTCCAGGCTCCCGAGTTGACCAAGT	60		
Sbjct 8150	AAACAGCAGAAGTTTCAAGGCCGCTGCCAGAGTCTCCAGGCTCCCGAGTTGACCAAGT	8209		
Query 61	CGACCTTCCGCCTCATTTAACTAACCAATCCCTACGCCCTCTCGCTTCTGTGCGCGCGC	120		
Sbjct 8210	TCGACCTTCCGCCTCATTTAACTAACCAATCCCGACGCCCTCTCGCTTCTGTGCGCGCGC	8269		
Query 121	TTTCTGAAATAAACGAGCCATCAG	145		
Sbjct 8270	TTTCTGCTATAAACGAGCCATCAG	8294		

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next](#) [▲ Previous](#) [◀ Descriptions](#)

**Feline leukemia virus LTR, partial sequence**  
 Sequence ID: [FJ476268.1](#) Length: 470 Number of Matches: 1

Range 1: 175 to 319 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
230 bits(124)	2e-56	138/145(95%)	0/145(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAACAGCATAAGTTTCAAGGCCGCTACCACAGTCTCCAGGCTCCCGAGTTGACCAAGT	60		
Sbjct 175	AAACAGCAGAAGTTTCAAGGCCACTGCCAGAGTCTCCAGGCTCCCGAGTTGACCAAGT	234		
Query 61	CGACCTTCCGCCTCATTTAACTAACCAATCCCTACGCCCTCTCGCTTCTGTGCGCGCGC	120		
Sbjct 235	CGACCTTCCGCCTCATTTAACTAACCAATCCCGACGCCCTCTCGCTTCTGTGCGCGCGC	294		
Query 121	TTTCTGAAATAAACGAGCCATCAG	145		
Sbjct 295	TTTCTGCTATAAACGAGCCATCAG	319		

3. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 200 bp ซึ่งจากการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR เมื่อนำมาทำการ Aligment ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกันมาก

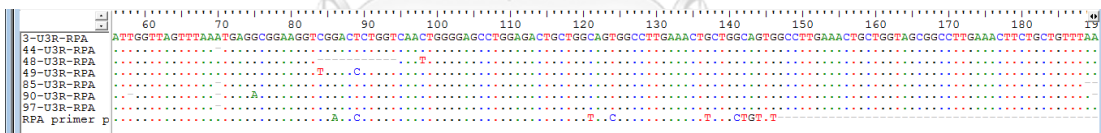


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 200 bp กับยีน U3LTR ของเชื้อ FeLV บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายกันที่ระดับร้อยละ 90 ขึ้นไปจนถึงระดับร้อยละ 99

Description	score	score	cover	value	Ident	Accession
Felvine leukemia virus LTR, complete sequence	265	265	92%	3e-67	99%	AY374188.1
Felvine leukemia virus LTR, complete sequence	265	265	92%	3e-67	99%	M37971.1
Felvine leukemia virus gene for gag-pol polyprotein pPr20, partial cds, isolate: CN33	211	211	76%	4e-51	98%	AB847229.1
Felvine leukemia virus U3 region LTR, partial sequence	207	370	73%	6e-50	98%	AY374210.1
Felvine leukemia virus clone 922.1 U3 region LTR, partial sequence	207	376	73%	6e-50	98%	AY374182.1
Felvine leukemia virus clone 1142.1 U3 region LTR, partial sequence	200	290	72%	1e-47	97%	AY374192.1
Felvine leukemia virus proviral DNA, long terminal repeat, partial sequence, clone: Mv7-1	193	264	92%	2e-45	90%	AB004013.1
Felvine leukemia virus clone Q27ThyT-4 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706379.1
Felvine leukemia virus clone Q27ThyT-1 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706378.1
Felvine leukemia virus clone N92LvT-9 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706377.1
Felvine leukemia virus clone N92LvT-1 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706375.1
Felvine leukemia virus clone N91LvT-6 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706374.1
Felvine leukemia virus clone N91LvT-4 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706373.1
Felvine leukemia virus clone N90LvT-1 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706369.1
Felvine leukemia virus clone N67ThyT-11 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706366.1
Felvine leukemia virus clone N65ThyT-9 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706362.1
Felvine leukemia virus clone N65ThyT-6 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706361.1
Felvine leukemia virus clone N65ThyT-1 LTR, partial sequence	189	357	68%	2e-44	97%	AY706360.1
Felvine leukemia virus clone N91LvT-1 LTR, partial sequence	185	354	68%	3e-43	96%	FJ476268.1
Felvine leukemia virus LTR, partial sequence	182	182	62%	4e-42	99%	FJ476268.1
Felvine leukemia virus clone N92LvT-5 LTR, partial sequence	182	348	68%	4e-42	95%	AY706376.1
Felvine leukemia virus isolate rK412.1 3' LTR, partial sequence	176	176	62%	2e-40	98%	FJ613295.1
Felvine leukemia virus isolate PCQ1022 3' LTR, partial sequence	176	176	62%	2e-40	98%	EU189498.1
Felvine leukemia virus isolate PCQ1039 3' LTR, partial sequence	176	176	62%	2e-40	98%	EU189498.1

5. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เกินจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตที่คาดหวังจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR และ RPA FeLV viral RNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และ RT-RPA ไปเปรียบเทียบกับยีน U3LTR ของเชื้อ FeLV บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายกันในระดับร้อยละ 95.24 และยังคงคล้ายกับยีน *v-myc* ที่ระดับเดียวกันด้วย



Sequences producing significant alignments

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Felvine leukemia virus strain Rickard subgroup A, complete genome	67.6	135	95%	2e-08	95.24%	AF052723.1
<input checked="" type="checkbox"/> Felvine Leukemia Virus DNA sequence	67.6	67.6	95%	2e-08	95.24%	L25632.1
<input checked="" type="checkbox"/> Felvine leukemia virus v-myc gene, complete cds	67.6	67.6	95%	2e-08	95.24%	M25762.1

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Felvine leukemia virus strain Rickard subgroup A, complete genome

Sequence ID: AF052723.1 Length: 8448 Number of Matches: 2

Range 1: 185 to 226 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
67.6 bits(36)	2e-08	40/42(95%)	0/42(0%)	Plus/Minus

Query 1 GCCTTGAAACTGCTGGTAGCGCCCTTGAAACTTCTGCTGTTT 42  
Sbjct 226 GCCTGGAGACTGCTGGTAGCGCCCTTGAAACTTCTGCTGTTT 185

Range 2: 8150 to 8191 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
67.6 bits(36)	2e-08	40/42(95%)	0/42(0%)	Plus/Minus

Query 1 GCCTTGAAACTGCTGGTAGCGCCCTTGAAACTTCTGCTGTTT 42  
Sbjct 8191 GCCTGGAGACTGCTGGTAGCGCCCTTGAAACTTCTGCTGTTT 8150

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Feline Leukemia Virus DNA sequence**  
Sequence ID: [L25632.1](#) Length: 2378 Number of Matches: 1

Range 1: 2224 to 2265 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
67.6 bits(36)	2e-08	40/42(95%)	0/42(0%)	Plus/Minus

Query 1 GCCTTGAACCTGCTGGTAGCGGCTTGAACTTCTGCTGTTT 42  
Sbjct 2265 GCCTGAGACTGCTGGTAGCGGCTTGAACTTCTGCTGTTT 2224

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Feline leukemia virus v-myc gene, complete cds**  
Sequence ID: [M25762.1](#) Length: 2721 Number of Matches: 1

Range 1: 2404 to 2445 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
67.6 bits(36)	2e-08	40/42(95%)	0/42(0%)	Plus/Minus

Query 1 GCCTTGAACCTGCTGGTAGCGGCTTGAACTTCTGCTGTTT 42  
Sbjct 2445 GCCTGAGACTGCTGGTAGCGGCTTGAACTTCTGCTGTTT 2404

6. เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 84 - 146 พบว่ามีลำดับดังนี้ ACTGCTGGCAGTGGCCTTGAA เรียงต่อกันจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 21 bp และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ลำดับที่ 84 - 161 มาเปรียบเทียบกับยีน U3LTR ของเชื้อ FeLV บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายกันที่ระดับร้อยละ 97.37

select all 37 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone O27ThyT-4 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706379.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone O27ThyT-1 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706378.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N92LivT-9 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706377.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N92LivT-1 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706375.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N91LivT-6 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706374.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N91LivT-4 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706373.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N91LivT-1 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706372.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N90LivT-5 LTR, partial sequence	130	408	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706371.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N90LivT-1 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706368.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N67ThyT-13 LTR, partial sequence	130	408	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706367.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N67ThyT-11 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706366.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N67ThyT-2 LTR, partial sequence	130	408	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706365.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N67ThyT-1 LTR, partial sequence	130	408	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706364.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N65ThyT-9 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706362.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N65ThyT-6 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706361.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone N65ThyT-1 LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY706360.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone 935.1 U3 region LTR, partial sequence	130	295	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY374212.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus clone 935.3 U3 region LTR, partial sequence	130	408	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY374211.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Feline leukemia virus U3 region LTR, partial sequence	130	289	97%	7e-27	97.37%	<a href="#">AY374210.1</a>

#### Feline leukemia virus clone O27ThyT-4 LTR, partial sequence

Sequence ID: [AY706379.1](#) Length: 252 Number of Matches: 3

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 142 to 217 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
130 bits(70)	7e-27	74/76(97%)	0/76(0%)	Plus/Minus

Query 1 ACTGCTGGCAGTGGCCTTGAACTGCTGGCAGTGGCCTTGAACTGCTGGTAGCGGCTT 60  
Sbjct 217 ACTGCTGGCAGTGGCCTTGAACTGCTGGCAGTGGCCTTGAACTGCTGGTAGCGGCTT 158

Query 61 GAAACTTCTGCTGTTT 76  
Sbjct 157 GAAACTTCTGCTGTTT 142

**Feline leukemia virus clone O27ThyT-1 LTR, partial sequence**  
 Sequence ID: [AY706378.1](#) Length: 252 Number of Matches: 3

Range 1: 142 to 217 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
130 bits(70)	7e-27	74/76(97%)	0/76(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACTGCTGGCAGTGGCC	TGAAACTGCTGGCAGTGGCC	TTGAAACTGCTGGT	AGCGGCTT 60
Sbjct 217	ACTGCTGGCAGTGGCC	TGAAACTGCTGGCAGTGGCC	TTGAAACTGCTGGCAGTGGCC	TT 158
Query 61	GAAACTTCTGCTGTTT		76	
Sbjct 157	GAAACTTCTGCTGTTT		142	

7. ตารางแสดงผลการตรวจหาเชื้อ FeLV Provirus ด้วยเทคนิค PCR, Nested PCR, RPA และ Nested RPA และ FeLV Viral RNA ด้วยเทคนิค Rapid immunochromatographic assay, เทคนิค RT-PCR และ RT-RPA แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วยการแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยตาเปล่าโดยใช้สี SYBR green I โดยที่ P หมายถึงตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก และ N หมายถึงตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเป็นลบ

No.	Test kit	RT-PCR 145 bp	RT-RPA 145 bp Gel	RT-RPA SYBR I	PCR 145 bp	RPA 145 bp Gel	RPA SYBR I	Nested PCR 101 bp	Nested RPA 101 bp Gel	Nested RPA SYBR I
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
3	P	P, 200bp	P, 200bp	P	200 bp	200 bp	P			
4	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N
5	P	P	P	N	P	P	P			
6	N	N	N	P	200 bp	P, 200 bp	P			
7	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P
8	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N
9	P	P	P	N	P	P	P			
10	P	P	P	N	P	P	P			
11	P	P	P	P	P	P	N			
12	P	P	P	N	P	P	P			
13	P	P	P	P	P	P	P			
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	P	P	P			
16	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P
17	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P
18	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P
19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	P	P	P	P	P	P	P			
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N
23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	200 bp	N	N		P	P

No.	Test kit	RT-PCR 145 bp	RT-RPA 145 bp Gel	RT-RPA SYBR I	PCR 145 bp	RPA 145 bp Gel	RPA SYBR I	Nested PCR 101 bp	Nested RPA 101 bp Gel	Nested RPA SYBR I
25	N	N	N	P	N	N	N	P	P	P
26	P	P	P	P	P	P	P			
27	P	P	P	P	P	P	P			
28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	P	P	P	P	P	P	P			
30	P	P	P	P	P	P	P			
31	P	P	P	P	P	P	P			
32	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
33	P	P, 200bp	P	P	P, 200 bp	P, 200 bp	P			
34	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
33	P	P, 200bp	P	P	P, 200 bp	P, 200 bp	P			
34	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	P	P	P	P	P	P	P			
36	P	P	P	P	P	P	N			
37	P	P	P	P	P	P	P			
38	P	P	P	P	P	P	P			
39	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
42	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
44	P	200 bp	P, 200bp	P	200 bp	200 bp	P			
45	P	P	P	P	P	P	P			
46	P	P	P	P	P	P	P			
47	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N
48	P	200 bp	N	N	200 bp	200 bp	P			
49	P	200 bp	P, 200bp	P	200 bp	200 bp	P			
50	P	P	P	P	P	P	P			
51	P	P	P	P	P	P	P			
52	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53	N	N	N	N	P	P	P			
54	P	P	N	N	P	P	P			
55	P	P	N	N	P	P	P			
56	P	P	P	N	P	P	P			
57	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
58	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
59	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
61	N	N	N	N	P	P	N			
62	P	P	P	P	P	P	P			
63	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
64	P	P	P	P	P	P	N			





No.	Test kit	RT-PCR 145 bp	RT-RPA 145 bp Gel	RT-RPA SYBR I	PCR 145 bp	RPA 145 bp Gel	RPA SYBR I	Nested PCR 101 bp	Nested RPA 101 bp Gel	Nested RPA SYBR I
109	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
110	P	P	P	P	P	P	P			
111	P	P	P	P	P	P	P			
112	P	P	P	P	P	P	P			
113	P	P	P	P	P	P	P			
114	P	200 bp	P, 200bp	P	200 bp	200 bp	P			
115	P	P	P	P	P	P	P			
116	P	P	P	P	P	P	P			
117	P	P	P	P	P	P	P			
118	P	P	P	N	P	P	P			
119	N	P	N	N	P	N	N		P	N
120	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
121	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
122	P	P	P	P	P	P	P			
123	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
124	N	N	N	N	P	P	N			



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม

1. Beatty J. Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond. *The Veterinary Journal*. 2014;201(2):174-80.
2. Priester WA, Mantel N. Occurrence of Tumors in Domestic Animals. Data From 12 United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1971;47(6):1333-45.
3. Hisasue M, Nagashima N, Nishigaki K, Fukuzawa I, Ura S, Katae H, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. *International Journal of Cancer*. 2009;124(5):1133-41.
4. Stutzer B, Muller F, Majzoub M, Lutz H, Greene CE, Hermanns W, et al. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *Journal of veterinary internal medicine*. 2010;24(1):192-7.
5. Teankum K, Sailasuta A. Pathology of the hematopoietic system. In: Teankum K, Kaewamatawong T, editors. *Systemic veterinary pathology*. 2 ed. Bangkok: Graphic Point Juristic Ordinary Partnership; 2007. p. 35-63.
6. Nedumpun T, Piamsomboon P, Chanchaithong P, Taweethavonsawat P, Chungpivat S, Suradhat S. Prevalence and distributions of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in bangkok and its vicinity, thailand during 2013-2014. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2015;45(3):449.
7. Miyake A, Watanabe S, Hiratsuka T, Ito J, Ngo MH, Makundi I, et al. Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. *Journal of virology*. 2016;90(9):4832-7.
8. Anderson MM, Lauring AS, Burns CC, Overbaugh J. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science*. 2000;287(5459):1828-30.
9. Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions D, et al. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *Journal of virology*. 1986;58(3):825-34.

10. Willett BJ, Hosie MJ. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *The Veterinary Journal*. 2013;195(1):16-23.
11. Rey MA. Investigation Into Subgroup C FeLV Interaction with Its Host Receptor FLVCR1 and the Role of FLVCR1 in Diamond Blackfan Anemia: University of Toronto; 2009.
12. Greggs WM, Clouser CL, Patterson SE, Mansky LM. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus. *Journal of General Virology*. 2012;93(4):900-5.
13. Fabrizio F, Calam AE, Dobson JM, Middleton SA, Murphy S, Taylor SS, et al. Feline mediastinal lymphoma: a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2014;16(8):637-44.
14. Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat - E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2013.
15. Hartmann K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses*. 2012;4(11):2684-710.
16. Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 2009;11(7):565-74.
17. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry*. 2016;62(7):947.
18. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Pérez-Osorio AC, Meyer JC, et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinase Polymerase Amplification. *PLOS ONE*. 2014;9(8):e103091.
19. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Danlami MB, Shu MH, Johari J, et al. Early detection of dengue virus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(3):830-7.
20. Wang J-c, Yuan W-z, Han Q-a, Wang J-f, Liu L-b. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 2017;243(Supplement C):55-60.

21. Wang J, Liu L, Wang J, Sun X, Yuan W. Recombinase Polymerase Amplification Assay—A Simple, Fast and Cost-Effective Alternative to Real Time PCR for Specific Detection of Feline Herpesvirus-1. PLOS ONE. 2017;12(1):e0166903.
22. Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A Virus-like particle associated with leukemia (Lymphosarcoma). Nature. 1964;202:567-9.
23. Rojko JL, Olsen RG. The immunobiology of the feline leukemia virus. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1984;6(1):107-65.
24. Hartmann JESaK. Feline Leukemia Virus Infection 2016 [updated Jul 10, 2016 cited 2017 Nov 17, 2017]. Available from: <https://veteriankey.com/feline-leukemia-virus-infection/>.
25. L Bolin L, Levy L. Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort 2011. 1681-98 p.
26. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, Lutz H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. Journal of General Virology. 2001;82(7):1589-96.
27. Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J. A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. Journal of Virology. 2006;80(7):3378-85.
28. Takeuchi Y, Vile RG, Simpson G, O'Hara B, Collins M, Weiss RA. Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus. Journal of virology. 1992;66(2):1219-22.
29. Anderson MM, Lauring AS, Robertson S, Dirks C, Overbaugh J. Feline Pit2 Functions as a Receptor for Subgroup B Feline Leukemia Viruses. Journal of Virology. 2001;75(22):10563-72.
30. Taylor CS, Willett BJ, Kabat D. A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. Journal of virology. 1999;73(8):6500-5.
31. Overbaugh J, Miller AD, Eiden MV. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2001;65(3):371-89, table of contents.

32. Elder JH, Mullins JI. Nucleotide sequence of the envelope gene of Gardner-Arnstein feline leukemia virus B reveals unique sequence homologies with a murine mink cell focus-forming virus. *Journal of virology*. 1983;46(3):871-80.
33. Overbaugh J, Donahue PR, Quackenbush SL, Hoover EA, Mullins JI. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science*. 1988;239(4842):906-11.
34. Donahue PR, Quackenbush SL, Gallo MV, deNoronha CM, Overbaugh J, Hoover EA, et al. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *Journal of Virology*. 1991;65(8):4461-9.
35. Chiu ES, Hoover EA, VandeWoude S. A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*. 2018;10(1):29.
36. Shalev Z, Duffy SP, Adema KW, Prasad R, Hussain N, Willett BJ, et al. Identification of a feline leukemia virus variant that can use THTR1, FLVCR1, and FLVCR2 for infection. *Journal of virology*. 2009;83(13):6706-16.
37. Ostrom B. Feline Leukemia Virus 2015 [updated March 16, 2015; cited 2017 Nov 17, 2017]. Available from: <http://rncvirology.blogspot.com/2015/03/>.
38. Gomes-Keller MA, Tandon R, Gönczi E, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*. 2006;112(1):11-21.
39. Gomes-Keller M, Gönczi E, Grenacher B, Tandon R, Hofman-Lehmann R, Lutz H. Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: a transmission potential. *Veterinary microbiology*. 2009;134(3):208-17.
40. Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*. 2003;91(6):467-70.
41. Pacitti AM, Jarrett O, Hay D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet Rec*. 1986;118(14):381-4.
42. Little S, Sears W, Lachtara J, Bienzle D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*. 2009;50(6):644-8.

43. Gleich SE, Krieger S, Hartmann K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 2009;11(12):985-92.
44. Akhtardanesh B, Ziaali N, Sharifi H, Rezaei S. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman–Iran: Seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. *Research in Veterinary Science*. 2010;89(2):306-10.
45. Bande F, Arshad SS, Hassan L, Zakaria Z, Sapian NA, Rahman NA, et al. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC veterinary research*. 2012;8(1):33.
46. Sukhumavasi W, Bellosa ML, Lucio-Forster A, Liotta JL, Lee AC, Pornmingmas P, et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand. *Veterinary parasitology*. 2012;188(1):25-30.
47. Brown M, Cunningham MW, Roca AL, Troyer JL, Johnson WE, O'Brien SJ. Genetic characterization of feline leukemia virus from Florida panthers. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(2):252.
48. Tangsudjai S, Malidang S, Phonarknguen R, Boonyarittichaikit R, Pattanarangsarn R, Buddhironawat R, et al. Feline leukemia virus (FeLV) in Captive wild felids in Thailand during 2004-2005. *Journal of Applied Animal Science* Vol. 2010;3(1-3).
49. Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*. 2005;332(1):272-83.
50. Major A, Cattori V, Boenzli E, Riond B, Ossent P, Meli ML, et al. Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary Research*. 2010;41(2):17.
51. Flynn JN, Dunham SP, Watson V, Jarrett O. Longitudinal Analysis of Feline Leukemia Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes: Correlation with Recovery from Infection. *Journal of Virology*. 2002;76(5):2306-15.
52. Levy J, Crawford C, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Little S, Sundahl E, et al. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2008;10(3):300-16.

53. Stewart H, Jarrett O, Hosie M, Willett B. Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? *Veterinary immunology and immunopathology*. 2011;143(3):325-31.
54. Tandon R, Cattori V, Pepin AC, Riond B, Meli ML, McDonald M, et al. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus research*. 2008;135(1):136-43.
55. Ogilvie GK, Tompkins MB, Tompkins WAF. Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosuppression. *Veterinary Microbiology*. 1988;17(3):287-96.
56. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1993;57(4):269-76.
57. Hoffmann-Fezer G, Mortelbauer W, Hartmann K, Mysliwietz J, Thefeld S, Beer B, et al. Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Research in Veterinary Science*. 1996;61(3):222-6.
58. Diehl LJ, Hoover EA. Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1992;5(12):1188-94.
59. Poulet H, Brunet S, Boularand C, Guiot AL, Leroy V, Tartaglia J, et al. Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. *The Veterinary record*. 2003;153(5):141-5.
60. Kaewmongkol G, Thaingtum K, Sirinarumitr T, Santivatr D, editors. Development of nested polymerase chain reaction for diagnosis of FeLV infection in cats. 45 Kasetart University Annual Conference, Bangkok (Thailand), 30 Jan-2 Feb 2007; 2007.
61. Miyazawa T, Jarrett O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Archives of virology*. 1997;142(2):323-32.
62. Suntz M, Failing K, Hecht W, Schwartz D, Reinacher M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010;136(1):71-80.

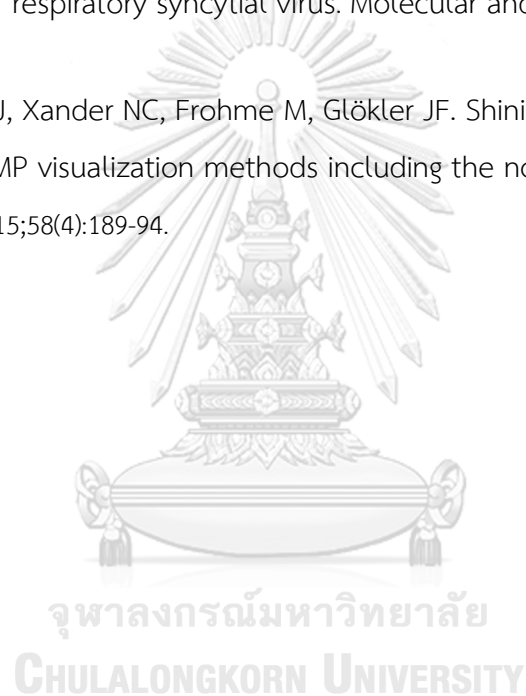


63. Weiss ATA, Klopfleisch R, Gruber AD. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 2010;12(12):929-35.
64. Bande F, Arshad SS, Hassan L, Zakaria Z. Molecular Detection, Phylogenetic Analysis, and Identification of Transcription Motifs in Feline Leukemia Virus from Naturally Infected Cats in Malaysia. *Veterinary Medicine International*. 2014;2014:10.
65. Helfer-Hungerbuehler AK, Widmer S, Kessler Y, Riond B, Boretti FS, Grest P, et al. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Research*. 2015;197:137-50.
66. Torres AN, O'Halloran KP, Larson LJ, Schultz RD, Hoover EA. Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008;123(1):81-9.
67. Onions D, Lees G, Forrest D, Neil J. Recombinant feline viruses containing the myc gene rapidly produce clonal tumours expressing T-cell antigen receptor gene transcripts. *International Journal of Cancer*. 1987;40(1):40-5.
68. Rasheed S, Gardner MB. Isolation of Feline Leukemia Virus From a Leopard Cat Cell Line and Search for Retrovirus in Wild Felidae<sup>23</sup>. *Journal of the National Cancer Institute*. 1981;67(4):929-33.
69. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLOS Biology*. 2006;4(7):e204.
70. Abd El Wahed A, El-Deeb A, El-Tholoth M, Abd El Kader H, Ahmed A, Hassan S, et al. A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e71642.
71. Yehia N, Arafa A-S, Abd El Wahed A, El-Sanousi AA, Weidmann M, Shalaby MA. Development of reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for avian influenza H5N1 HA gene detection. *Journal of Virological Methods*. 2015;223(Supplement C):45-9.
72. Wang Z-H, Wang X-J, Hou S-H. Development of a recombinase polymerase amplification assay with lateral flow dipstick for rapid detection of feline parvovirus. *Journal of Virological Methods*. 2019;271:113679.

73. Buderer NMF. Statistical Methodology: I. Incorporating the Prevalence of Disease into the Sample Size Calculation for Sensitivity and Specificity. *Academic Emergency Medicine*. 1996;3(9):895-900.
74. Ghosh SK, Roy-Burman P, Faller DV. Long terminal repeat regions from exogenous but not endogenous feline leukemia viruses transactivate cellular gene expression. *Journal of virology*. 2000;74(20):9742-8.
75. Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, Meli ML, Golder MC, Lutz H, et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 2005;130(1):124-32.
76. Tozon N, Nemec Svete A, Zemljic M, Pipan M, Barlic-Maganja D. High prevalence of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in Slovenia. *Acta Veterinaria*. 2008;58.
77. SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X concentrate in DMSO 2006 [Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07567.pdf>.
78. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2008;56(1):45-50.
79. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
80. Sumi R, Miyake A, Endo T, Ohsato Y, Ngo MH, Nishigaki K. Polymerase chain reaction-based detection of myc transduction in feline leukemia virus-infected cats. *Archives of Virology*. 2018;163(4):1073-7.
81. Westman ME, Malik R, Hall E, Sheehy PA, Norris JM. Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;50:88-96.
82. Boenzli E, Hadorn M, Hartnack S, Huder J, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Detection of antibodies to the feline leukemia Virus (FeLV) transmembrane protein p15E: an alternative approach for serological FeLV detection based on antibodies to p15E. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):2046-52.

83. Meichner K, Kruse DB, Hirschberger J, Hartmann K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Veterinary Record*. 2012;171(14):348-.
84. Hisasue M, Okayama H, Okayama T, Suzuki T, Mizuno T, Fujino Y, et al. Hematologic Abnormalities and Outcome of 16 Cats with Myelodysplastic Syndromes. *Journal of veterinary internal medicine*. 2001;15(5):471-7.
85. Da Costa F, Valle S, Machado G, Corbellini L, Coelho E, Rosa R, et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017;37:1531.
86. Collado, Doménech A, Miró G, Martín, Escolar, Gomez-Lucia E. Epidemiological Aspects and Clinicopathological Findings in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus (FeLV) and/or Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2012;2:13-20.
87. Cong W, Meng Q-F, Blaga R, Villena I, Zhu X-Q, Qian A-D. *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors. *Parasitology Research*. 2016;115(1):217-23.
88. Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;45:53-8.
89. Nesina S, Katrin Helfer-Hungerbuehler A, Riond B, Boretti FS, Willi B, Meli ML, et al. Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology*. 2015;12(1):105.
90. Coelho FM, Bomfim MRQ, de Andrade Caxito F, Ribeiro NA, Luppi MM, Costa ÉA, et al. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of General Virology*. 2008;89(11):2799-805.
91. Westman M, Norris J, Malik R, Hofmann-Lehmann R, Harvey A, McLuckie A, et al. The Diagnosis of Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infection in Owned and Group-Housed Rescue Cats in Australia. *Viruses*. 2019;11(6):503.

92. Wilkes RP, Anis E, Dunbar D, Lee P-YA, Tsai Y-L, Lee F-C, et al. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. *Journal of feline medicine and surgery*. 2018;20(4):362-9.
93. Cavalcante LTF, Muniz CP, Jia H, Augusto AM, Troccoli F, Medeiros SdO, et al. Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats. *Viruses*. 2018;10(12):702.
94. Xu Y-z, Fang D-z, Chen F-f, Zhao Q-f, Cai C-m, Cheng M-g. Utilization of recombinase polymerase amplification method combined with lateral flow dipstick for visual detection of respiratory syncytial virus. *Molecular and Cellular Probes*. 2019:101473.
95. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining a light on LAMP assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*. 2015;58(4):189-94.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สิทธิโชค ลาชโรจน์
วัน เดือน ปี เกิด	19 พฤศจิกายน 2519
สถานที่เกิด	สตูล
วุฒิการศึกษา	สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	162/26 หมู่ที่ 5 ตำบลเสาธงหิน อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY